

РОЗРОБЛЕННЯ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА МЕТОДІВ ЇХ КОНТРОЛЮ

УДК 54.062/543.054/.422.31/.54
doi: 10.36359/scivp.2019-20-2.49

ЗАСТОСУВАННЯ НОВОГО УЕРХ-МС/МС МУЛЬТИМЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ КОНТРОЛЮ БЕЗПЕКИ МЕДУ

*М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. І. Плотиця, молодший науковий співробітник,
Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
А. М. Заярнюк, старший лаборант з в/о,
О. М. Паздерська, науковий співробітник*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті представлено результати впровадження розробленого УЕРХ-МС/МС мультиметоду для кількісного визначення залишків різних груп антимікробних препаратів у меду. Основною перевагою цього методу є простота, експресність та економічна ефективність, оскільки аналіз проводиться за однієї пробопідготовки. Методику апробовано при аналізі нативно контамінованих та фортифікованих зразків меду, а також при проведенні міжлабораторних досліджень. За період 2018-2019 років з використанням розробленого нами мультиметоду було проаналізовано 809 експортних партій меду за показниками безпеки, а також 946 зразків – для вхідного контролю сировини. Найчастіше проводились дослідження меду на вміст залишків метронідазолу та хлорамфеніколу, а саме – 68 % та 52 % аналізованих зразків, відповідно. Виявлено, що серед зразків вхідного контролю меду 297 містили цільові аналіти на рівні, вищому за межу виявлення методу. Це чітко свідчить про непоодинокі факти використання українськими бджолярами незареєстрованих антимікробних препаратів для лікування та/або профілактики хвороб бджіл. Отримані дані не претендують на високу репрезентативність, оскільки базуються на аналізі зразків меду безпосередньо від замовників, а не отримані внаслідок моніторингу шляхом випадкового вибору проб.

Ключові слова: МЕД, ВХІДНИЙ КОНТРОЛЬ, МУЛЬТИМЕТОД, УЕРХ-МС/МС, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ.

Мед є важливим харчовим дієтичним продуктом та джерелом вуглеводів. Відповідно до законодавства ЄС, мед – це натуральна солодка субстанція, яка виробляється медоносними бджолами *Apis mellifera* з нектару рослин або з секретій частин рослин чи екскрецій рослинно-сисних комах на живих частинах рослин, які бджоли збирають, змінюють, комбінуючи зі своїми особливими речовинами, відкладають, зневоднюють, зберігають та залишають у медових стільниках для витримування і досягання. Мед, призначений для споживання

людиною, не має містити будь-яких сторонніх інгредієнтів, тобто будь-яких органічних або неорганічних речовин, не притаманних його складу [1].

Як і всі живі організми, медоносних бджіл вражають різноманітні хвороби інфекційного характеру: паразитарні, бактеріальні та вірусні. Американський гнилець – найнебезпечніше захворювання бджіл, викликане бактерією *Paenibacillus larvae*, здатною до утворення спор, стійких впродовж багатьох років. У деяких країнах вимагається спалювати уражені гнильцем вулики; в країнах ЄС, США, Канаді, Аргентині дозволяли використовувати певні антибіотики для контролю захворювання. Антимікробні агенти можуть лише пом'якшити захворювання, щоб запобігти спалаху гнильцю, але не усувають збудника [2]. Європейський гнилець – викликається бактерією *Melissococcus plutonius*; вважається менш загрозливим, ніж американський гнилець, але потребує тривалого застосування окситетрацикліну, оскільки бактерія зберігає життєздатність протягом кількох місяців [3]. Нозематоз – ураження травного тракту бджіл, викликане одноклітинними паразитами роду *Nosema apis*. Для лікування застосовували сульфаніламідний препарат сульфадиметоксин [4].

Неоднаковою ефективністю проти інфекційних захворювань бджіл характеризуються різні групи антимікробних діючих речовин. Тетрацикліни, зокрема окситетрациклін, – антибіотики широкого спектру дії, з довгою історією використання у ветеринарії для лікування і профілактики широкого спектру бактеріальних інфекцій. Стрептоміцин – аміноглікозидний антибіотик, який використовували в бджільництві для захисту бджіл від різноманітних захворювань розплоду. Незважаючи на те, що цей препарат не дозволений у більшості країн (ЄС, США), у Китаї стрептоміцин поряд з хлорамфеніколом інтенсивно використовували для контролю великого спалаху американського гнильцю у 1997 році. Сульфонаміди відіграють важливу роль як ефективні хіміотерапевтичні засоби для бактеріальних і протозойних захворювань у ветеринарії. Їх часто вводять у поєднанні з інгібіторами дигідрофолатредуктази групи діамінопіримідинів, зокрема, – триметопримом. Використання сульфаніламідів для захисту медоносних бджіл від бактеріальних захворювань було загальноприйнятою практикою в комерційному бджільництві після того, як було встановлено, що сульфаніламід, зокрема сульфатіазол, може перешкоджати поширенню американського гнильцю, запобігаючи проростанню репродуктивних спор збудників. Незважаючи на ефективність, висока стабільність сульфаніламідів у меді навіть при тривалому зберіганні викликає проблеми розвитку антибіотикорезистентності бактерій. Тилозин – макролідний антибіотик, застосовували у бджільництві в усьому світі. Зокрема, у США FDA (Food and Drug Administration) рекомендували його для лікування активного гнильцю, однак не для профілактичного використання у здорових колоніях, при тому його застосування слід припинити принаймні за чотири тижні до медозбору. Повідомлення авторів щодо ефективності іншого макролідного антибіотика еритроміцину для лікування американського та європейського гнильцю часом різняться, але його теж застосовували у бджільництві. Лінкоміцин разом з тилозином був випробуваний FDA як потенційний препарат для лікування резистентних до тетрацикліну уражених американським гнильцем колоній медоносних бджіл. Хлорамфенікол – потужний антибіотик широкого спектру дії, потенційний канцероген, заборонений у ЄС з 1994 року для лікування продуктивних тварин, зокрема, медоносних бджіл (1430/94/ЄС). Нітрофурани (фуразолідон, фурафалдон, нітрофурантоїн, нітрофуразон) – ефективні синтетичні антибіотики антипротозойної та протигрибкової дії, теж заборонені в ЄС для лікування продуктивних тварин (37/2010/ЄС). Нітрофурани швидко метаболізують, а тому про їх неавторизоване використання свідчать їх метаболіти АОЗ, АМОЗ, АНД, SEM. Нітроімідазоли (метронідазол, диметридазол, ронідазол) – заборонені речовини для всіх видів продуктивних тварин (37/2010/ЄС). Однак, у Китаї в останні роки нітроімідазоли зазвичай використовували для боротьби з нозематозом у вуликах, як альтернативу фумагілліну (антимікробний агент, схвалений у США та Канаді) [5].

Через проблему антибіотикорезистентності, потенційну небезпеку для здоров'я людини та встановлену нульову толерантність до залишків антибіотиків та хіміотерапевтичних засобів у меді, використання антимікробних препаратів у бджільництві суворо регулюється в ЄС, США і Канаді, де їх застосування можливе тільки з дозволу ветеринарного лікаря [6-9]. В Україні питання маркування, виробництва і продажу меду регламентується положеннями національного стандарту України ДСТУ № 4497:2005 «Мед натуральний», виконання якого має добровільний характер, що може створювати певні перешкоди для успішного експорту цього важливого продукту.

Згідно з європейською системою RASFF, не зважаючи на заборону використання антибіотиків у бджільництві, все ще є багато повідомлень щодо їх виявлення у меді [10]. Моніторинг та контроль залишків антимікробних препаратів в натуральному меді є обов'язковою вимогою для експорту та імпорту меду по всьому світу. Однак, на сьогодні немає єдиних гармонізованих світових вимог стосовно показників безпеки меду [11]. Тому при визначенні відповідності партій меду користуються, насамперед, значеннями регуляторних меж, які інколи можуть бути нижчими за мінімально необхідні межі визначення (MRPL), що встановлені для небагатьох аналітів, та інструментальними можливостями референсних лабораторій (зокрема, значеннями $CC\alpha$ та $CC\beta$ для конкретних аналітів та методик їх визначення).

Впровадження і використання мультиметодів має ряд переваг: в разі скорочується тривалість аналізу, зменшується розхід необхідного посуду, реактивів, навантаження на персонал лабораторії, на основне і додаткове обладнання. Мультикомпонентний УЕРХ-МС/МС аналіз відповідає вимогам сьогодення для контролю різного класу аналітів у меді, значно зменшуючи ймовірність як хибно негативних, так і хибно позитивних результатів.

Тому, у зв'язку з підвищенням вимог до контролю безпечності зразків меду нами запропоновано та впроваджено метод одночасного визначення залишків різних груп антимікробних препаратів (амфеніколів, нітроїмідазолів, метаболітів нітрофуранів, тетрациклінів, сульфаніламідів) високочутливим та високоселективним методом УЕРХ-МС/МС, який забезпечує надійний та швидкий аналіз партій бджолиного меду.

Матеріали і методи. *Реактиви.* Метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore), форміатна кислота (Riedel-de-Haën), хлоридна кислота (Riedel-de-Haën), 2-нітробензальдегід (Sigma-Aldrich), диметилсульфоксид (HPLC, Lab-scan), калій гідрофосфат (Riedel-de-Haën), натрій гідроксид (Fluka Analytical), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich), гексан (HPLC, Lab-scan), тетрахлорметан (Pestiscan, Lab-scan).

Стандарти. Стандарти хлорамфеніколу (CAP), метронідазолу (MTZ), метаболітів нітрофуранів AOZ, AMOZ, AHD, SEM, дериватизованих метаболітів NP-AOZ, NP-AMOZ, NP-AHD, NP-SEM, тетрацикліну (TTC), окситетрацикліну (OTC), хлортетрацикліну (CTC), доксицикліну (DOX), сульфагуанідину (SGD), сульфаніламідів (SAD), сульфадіазину (SDZ), сульфаметоксазолу (SMX), сульфатіазолу (STZ), сульфамеразину (SMR), сульфаметазину (SMZ), сульфаметоксипіридазину (SMP), сульфаклоропіридазину (SCP), сульфадиметоксину (SDM), триметоприму (TMP) (Sigma-Aldrich, Vetranal analytical standart).

Основні стандартні розчини кожного аналіту індивідуально готували з первинною концентрацією 1,0 мг/мл у метанолі. Розчини стандартів зберігали впродовж двох місяців у щільно закритому посуді у холодильнику за температури 2-8 °С, крім стандартів тетрациклінів, розчини яких зберігали за мінус 20 °С. Наступні розчини стандартів готували послідовними розведеннями до концентрації 100 нг/мл метанолом, а нижчі концентрації – 0,1% розчином форміатної кислоти в 30 % розчині метанолу.

Обладнання. Рідинний хроматограф ACQUITY UPLC H-Class з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Xevo TQ-S Micro фірми Waters (США),

обладнаний колонкою AQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 50 mm x 2.1 mm) із передколонукою ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (1.7 μ m, 5 mm x 2.1 mm) фірми Waters (США).

Приготування зразків. Процедура підготовки зразків меду для мультианалітного визначення антимікробних препаратів різних груп складається з таких основних етапів: розчинення зразка у воді, кислотний гідроліз та дериватизація, нейтралізація буферним розчином, динамічна екстракція етилацетатом, розділення органічної та водної фаз шляхом центрифугування, концентрування зразка, знежирення з використанням суміші гексан : тетрахлорметан та перерозчинення сухого залишку у мобільній фазі, додаткова очистка екстракту мікроцентрифугуванням за охолодження та перенесення верхнього водно-метанольного шару у хроматографічні віали.

Побудова калібрувальних графіків. Для побудови калібрувальних графіків на стандартах використовують розчини сумішей стандартів груп аналітів (дериватизованих метаболітів нітрофуранів – NP-AOZ, NP-AMOX, NP-AHD, NP-SEM; хлорамфеніколу та метронідазолу – CAP, MTZ; сульфаніламідів та триметоприму – SGD, SDZ, SMX, STZ, SMR, SMZ, SMP, SCP, SDM, SAD, TMP; та тетрациклінів – TTC, OTC, CTC, DOX) з концентрацією 0,05-10 нг/мл.

Для побудови калібрувальних графіків на матриці меду навантажували контрольний мед, що не містить аналітів, відповідні об'єми стандартних розчинів сумішей аналітів (AOZ, AMOX, AHD, SEM; CAP, MTZ; TTC, OTC, CTC, DOX; SGD, SDZ, SMX, STZ, SMR, SMZ, SMP, SCP, SDM, SAD, TMP) із концентрацією кожного аналіту 100 і 10 нг/мл (табл. 1) та проводили пробопідготовку за описаною вище схемою.

Таблиця 1

Схема побудови калібрувальних графіків на матриці меду для визначення різних груп антимікробних препаратів

Об'єм стандартного розчину суміші аналітів з концентрацією 10 нг/мл, мкл	Об'єм стандартного розчину суміші аналітів з концентрацією 100 нг/мл, мкл	Концентрація аналітів у меді, мкг/кг
-	-	0
10	-	0,05
20	-	0,1
50	-	0,25
100	-	0,5
200	-	1,0
-	40	2,0
-	100	5,0
-	200	10,0

Хроматографічний аналіз.

Параметри хроматографічної системи:

Час стабілізації колонки – 1 хв.

Співвідношення мобільних фаз А/В = 75/25 (об./об.).

Швидкість потоку 0,6 мл/хв.

Час проведення розділення 2,5 хв.

Температура колонки 40 °С.

Розділення аналітів проводили за таким градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0:00	75,0	25,0
0:09	75,0	25,0
0:10	5,0	95,0
0:75	5,0	95,0
0:80	75,0	25,0
2:00	75,0	25,0

Параметри мас-спектрометричного детектора:

Час інтегрування – 2,5 хв.

Іонне джерело – електророзпилювач (ESI).

Температура джерела (Source Temperature) – 150 °C

Температура висушування (Desolvation Temperature) – 600 °C

Газ зіткнення (Collision Gas) – аргон

Тиск аргону: $4,0 \times 10^{-3}$ mbar

Газ висушування (Desolvation Gas) – азот

Потік газу висушування – 1000 L/hr

Газ розпилення (Nebulisation Gas) – азот

Потік газу розпилення – 50 L/hr

Параметри сканування мас наведено у табл. 2

Визначення вмісту метаболітів нітрофуранів, хлорамфеніколу, метронідазолу, тетрациклінів, сульфаніламідів та триметоприму в досліджуваних зразках меду (мкг/кг) проводили згідно з калібрувальними кривими, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати й обговорення. Значними перевагами розробленого нами мультиметоду визначення залишкових кількостей різних груп антибіотиків у меді з використанням ультраефективного рідинного хроматографа з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором є експресність, висока селективність та чутливість визначення залишків антимікробних препаратів у меді. Однак головна його перевага – можливість одночасного контролю залишкових кількостей сульфаніламідів та тетрациклінів з метаболітами нітрофуранів, визначення яких методом ВЕРХ-МС/МС, як відомо, є практично неможливим без проведення дериватизації. Для проведення УЕРХ-МС/МС досліджень нами було поєднано та модифіковано декілька типових схем пробопідготовки зразків меду для різноманітних аналітів. Так, основними етапами цих процедур є: кислотний гідроліз сполук аналітів з матричними компонентами меду різної природи, дериватизація метаболітів нітрофуранів 2-нітробензальдегідом, нейтралізація реакційного середовища для забезпечення прийняттого ступеня переходу цільових аналітів з водної фази у органічну, а саме – етилацетат [12-16]. Як правило, за проведення аналізу залишків антибіотиків у меді та з метою одночасної очистки екстракту меду від компонентів матриці і концентрування зразка, застосовують твердофазну екстракцію, зокрема, на іонообмінних колонках [14, 16]. Як відомо, така процедура потребує додаткової затрати ресурсів та часу, що відчутно підвищує вартість аналізу. Нами запропонована проста у виконанні методика, яка не вимагає застосування додаткових способів очистки зразків, таких як фільтрування чи твердофазна екстракція, а базується на вилученні аналітів шляхом екстракції “рідина-рідина”, застосуванні центрифугування з охолодженням та знежирювальних агентів. Таким чином, вдалося досягнути високих аналітичних характеристик мультиметоду практично без додаткових затрат часу та ресурсів.

На рис. 1-6 наведено приклади калібрувальних графіків для визначення основних представників різних груп цільових антимікробних препаратів, побудованих на матриці чистого (контрольного) меду, у діапазоні концентрацій від 0 - 1,0; 0 - 2,0 та 0 - 10,0 мкг/кг залежно від досліджуваного аналіту.

Таблиця 2

Параметри сканування мас (MRM) для УЕРХ-МС/МС визначення груп антимікробних препаратів у меді

Аналіт	Режим іонізації	Прекурсор-іон, m/z	Продукт-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Енергія зіткнення (Collision Energy), V
NP-AOZ	ES+	236,1	103,9	26	20
			133,9		10
NP-AMOZ	ES+	335,1	127,9	20	22
			262,1		14
NP-AHD	ES+	249,0	104,0	30	20
			134,0		10
NP-SEM	ES+	209,0	134,0	15	10
			192,0		10
CAP	ES-	320,9	151,9	40	18
			257,0		10
			194,0		10
MTZ	ES+	172,0	128,0	23	22
			82,0		12
TTC	ES+	445,27	154,0	24	26
			410,21		16
			427,3		16
OCT	ES+	465,25	337,15	25	27
			426,20		19
			443,25		11
CTC	ES+	479,25	154,05	12	27
			444,20		20
			462,20		16
DOX	ES+	445,27	154,0	36	28
			339,2		25
			410,2		23
SDZ	ES+	251,3	92,0	15	24
			108,0		22
			156,0		14
SMX	ES+	254,1	92,0	10	25
			107,9		23
			155,9		14
STZ	ES+	256,2	92,0	25	26
			108,0		22
			156,0		12
SMR	ES+	265,2	92,0	20	32
			107,7		24
			156,0		14
SMZ	ES+	279,2	92,0	14	28
			108,0		27
			186,0		16
SMP	ES+	281,2	92,0	18	28
			108,0		24
			156,0		14
SCP	ES+	285,2	91,9	10	30
			107,9		24
			155,9		14
SDM	ES+	311,2	92,0	32	32
			108,0		26
			156,0		20
TMP	ES+	291,2	123,0	48	22
			230,1		22
			261,1		22

Compound name: CAP
Correlation coefficient: $r = 0.999892$, $r^2 = 0.999784$
Calibration curve: $1925.92 * x + 53.7082$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

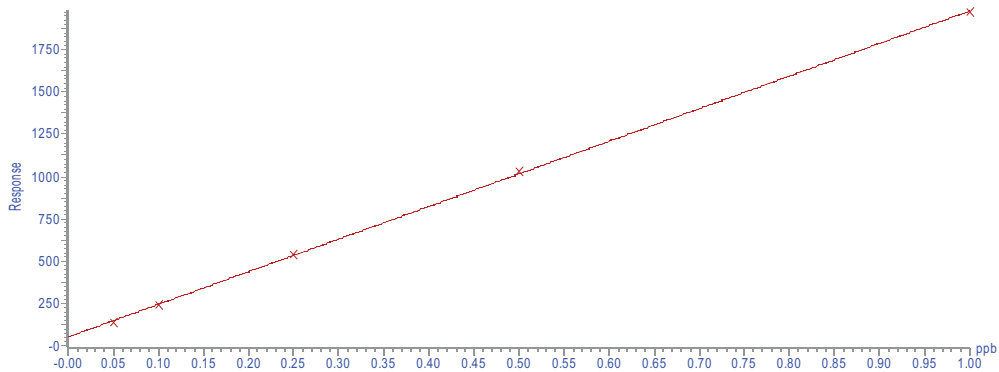


Рис. 1. Калібрувальний графік для визначення залишків хлорамфеніколу в меді в діапазоні концентрацій 0,05-1,0 мкг/кг.

Compound name: MTZ
Correlation coefficient: $r = 0.999350$, $r^2 = 0.998700$
Calibration curve: $379665 * x + 11008.5$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

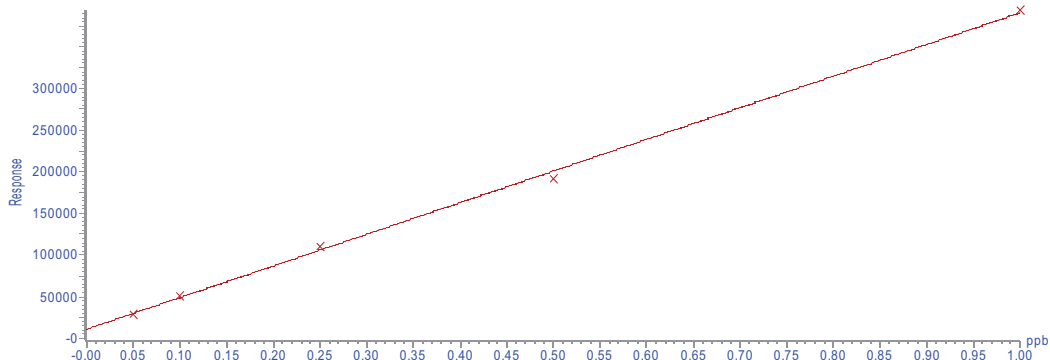


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення залишків метронідазолу в меді в діапазоні концентрацій 0,05-1,0 мкг/кг.

Compound name: NP-AOZ
Correlation coefficient: $r = 0.998904$, $r^2 = 0.997808$
Calibration curve: $20412.7 * x + 566.482$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

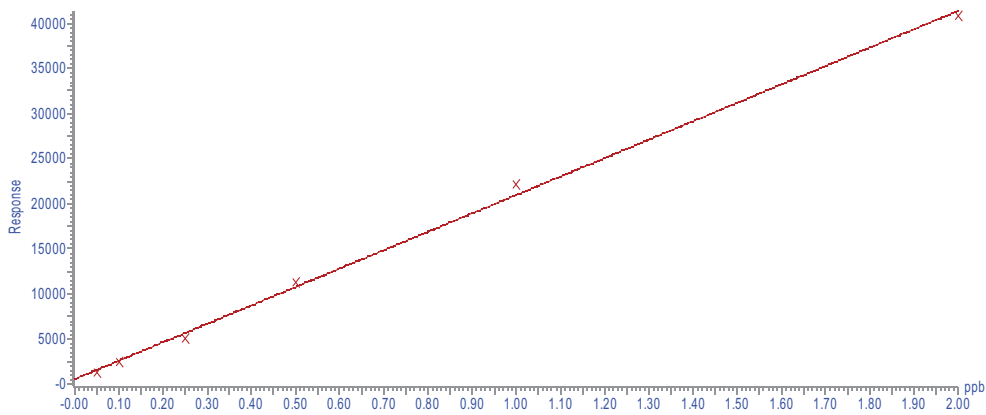


Рис. 3. Калібрувальний графік для визначення залишків метаболіту нітрофурану АОЗ в діапазоні концентрацій 0,05-2,0 мкг/кг.

Compound name: STZ
Correlation coefficient: $r = 0.999681$, $r^2 = 0.999363$
Calibration curve: $24305.6 * x + 1301.65$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

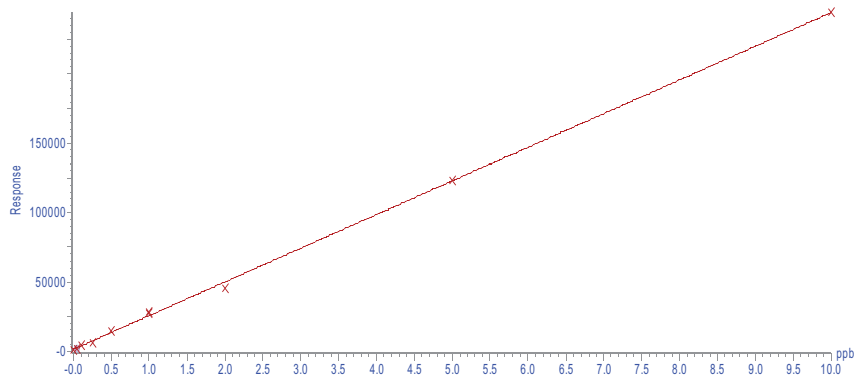


Рис. 4. Калібрувальний графік для визначення залишків сульфатіазолу в діапазоні концентрацій 0,05-10,0 мкг/кг.

Compound name: TMP
Correlation coefficient: $r = 0.999938$, $r^2 = 0.999876$
Calibration curve: $109122 * x + 6688.23$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

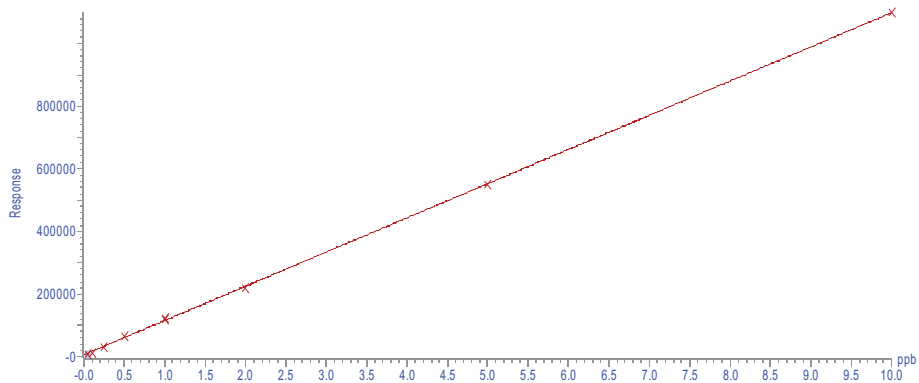


Рис. 5. Калібрувальний графік для визначення залишків триметоприму в діапазоні концентрацій 0,05-10,0 мкг/кг.

Compound name: Chlortetracycline
Correlation coefficient: $r = 0.999242$, $r^2 = 0.998485$
Calibration curve: $1826.47 * x + -20.0945$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

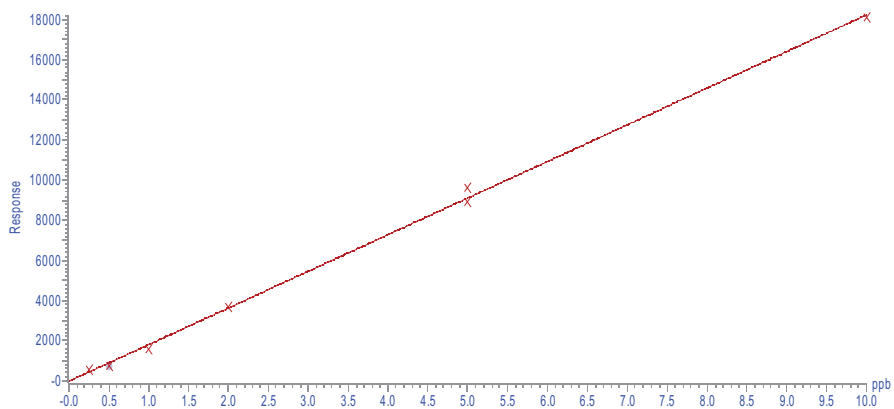


Рис. 6. Калібрувальний графік для визначення залишків хлортетрацикліну в діапазоні концентрацій 0,25-10,0 мкг/кг.

Деякі валідаційні параметри розробленої УЕРХ-МС/МС методики одночасного кількісного визначення різних груп антимікробних препаратів у меді наведено у табл. 3. Оцінку придатності запропонованої методики для аналізу зразків меду проводили за критерієм “додано-отримано” за результатами дослідження шести контрольних (чистих) зразків меду та навантажених сумішшю стандартних розчинів на чотирьох різних концентраційних рівнях залежно від досліджуваних аналітів 0,2, 0,5, 1,0 мкг/кг (табл. 3) з розрахунками концентрацій за калібрувальними графіками на матриці меду. Запропонований метод забезпечує селективне визначення цільових аналітів з чутливістю у діапазоні від 0,05 мкг/кг для хлорамфеніколу до 2 мкг/кг для сульфаніламідів та тетрацикліну.

Як видно з представлених даних, впроваджена нами методика за чутливістю перевищує вимоги встановлених MRPL чи регуляторних меж за достатнього рівня прецизійності методики та високого відсотка витягу, що узгоджується з вимогами Рішення 2002/657/ЕС.

Таблиця 3

Деякі валідаційні параметри методики УЕРХ-МС/МС визначення різних груп антимікробних препаратів у меді

Аналіт	MRPL*, мкг/кг	Межа детектування LOD, мкг/кг	Межа визначення LOQ, мкг/кг	Витяг, %
CAP	0,3	0,05	0,10	97-112
MTZ	3	0,10	0,20	93-103
AOZ	1	0,10	0,20	99-103
AMOX	1	0,10	0,20	96-99
AHD	1	0,15	0,30	82-102
SEM	1	0,20	0,45	82-103
SGD	5	0,50	1,0	96-102
SDZ	5	0,20	0,40	96-104
SMX	5	0,25	0,45	89-104
STZ	3	0,15	0,30	93-102
SMR	5	0,20	0,40	93-104
SMZ	5	0,15	0,30	94-101
SMP	5	0,10	0,15	97-101
SCP	5	0,10	0,20	96-103
SDM	5	0,20	0,45	97-103
TMP	5	0,10	0,20	87-103
SAD	5	2,0	4,0	96-99
TTC	5	2,0	4,0	91-105
OCT	5	0,50	1,5	88-99
CTC	5	0,50	1,0	91-103
DOX	5	0,25	0,75	82-98

Примітка: * – регуляторна межа, якщо немає встановленого значення MRPL

Розроблену методику УЕРХ-МС/МС визначення залишків різних груп антимікробних препаратів у меді апробовано при аналізі реальних та фортифікованих зразків меду, а також при проведенні міжлабораторних досліджень з акредитованими лабораторіями. Згідно з результатами, метод показав себе як високоспецифічний та чутливий, а можливість одночасного визначення багатьох аналітів значно здешевлює та прискорює проведення контролю зразків меду.

За період 2018-2019 років з використанням розробленого нами мультиметоду було проаналізовано за основними показниками 809 експортних партій меду, а також 946 зразків меду – за договірною тематикою для проведення вхідного контролю сировини на вміст залишків хлорамфеніколу, нітроїмідазолів, сульфаніламідів, тетрациклінів та метаболітів нітрофуранів для підприємств, які займаються експортом українського меду (табл. 4).

Результати дослідження залишків різних груп антимікробних препаратів у зразках меду методом УЕРХ-МС/МС, проведених за договірними тематиками за 2018-2019 рр.

Аналіт	Метронідазол	Хлорамфенікол	Метаболіти нітрофуранів*	Сульфаніламід та триметоприм**	Тетрацикліни
Проаналізовано зразків	648	494	174	32	18
Частка замовлень, %	68	52	20	3	2
Всього зразків	946				

Примітка: * – з них 38 зразків тільки на SEM, а 15 – тільки на АОЗ

** – з них 11 зразків тільки на STZ

Найчастіше проводились дослідження меду на вміст залишків метронідазолу та хлорамфеніколу, а саме – 68 % та 52 % аналізованих зразків відповідно (табл. 4). Це може бути пов'язане з ризиками неавторизованого застосування пасічниками препаратів гуманної медицини, що містять хлорамфенікол чи метронідазол, або контрафактних препаратів для бджіл виробництва Російської Федерації, де офіційно зареєстровано препарати з метронідазолом для лікування медоносних бджіл [17]. Щодо хлорамфеніколу, то на сьогодні основною причиною виявлення його залишків у меді є використання препаратів, що містять суміш хлорамфеніколу та його SS-пара-стереоізомеру декстраміцину. Ізомер не має терапевтичної дії, однак неодноразово був виявлений незадекларованим у контрафактних препаратах для бджіл, і як наслідок – у меді [18]. Метод імуноферментного аналізу, який найчастіше використовують для вхідного контролю сировини на медових підприємствах, не забезпечує адекватного контролю щодо залишків декстраміцину. Майже 20 % замовлень стосувалися визначення залишків метаболітів нітрофуранів, причому найчастіше метаболітів фуразолідону (АОЗ) та нітрофуразону (SEM). Це також може бути пов'язано з використанням препаратів гуманної медицини, що містять такі діючі речовини [16]. Серед сульфаніламідів найактуальнішим було визначення сульфатіазолу, який часто використовують для лікування і профілактики американського гнильця – одного із найнебезпечніших захворювань бджіл. Групове дослідження на сульфаніламідів проводилось для значно меншої кількості зразків, як і для триметоприму, який, як відомо, застосовується тільки у комбінації із сульфаніламидами [19, 20].

Із проаналізованих 946 зразків меду за договірними тематиками для проведення вхідного контролю сировини, 649 зразків виявились відповідними, тобто 68% тестованих зразків не містили цільових аналітів на рівні, вищому, за межу виявлення розробленого мультиметоду (табл. 5). Натомість 297 зразків, за результатами проведених досліджень, містили залишки антибіотиків чи антимікробних препаратів. 49 зразків виявились позитивними по двох показниках (найчастіше по хлорамфеніколу та метронідазолу, з них три зразки – по сульфатіазолу з триметопримом), 7 зразків – по трьох, а 2 зразки – по чотирьох. У двох випадках аналізовані зразки купаженого меду містили одночасно 5 та 6 цільових аналітів на концентраційних рівнях вище LOD.

Аналіз виявлених у дослідженому меді залишкових кількостей антимікробних препаратів показав, що перевищення MRPL (чи регуляторної межі для сполук, що не мають встановлених значень MRPL) спостерігалось з такою частотою: метронідазолу – у 4 % випадків, хлорамфеніколу – в 11 %, АОЗ та SEM – в 1 %, тетрациклінах – у 17 %, позитивних зразків по АМОЗ та АНД не було виявлено взагалі. Найчастіше перевищення регуляторної межі 3 мкг/кг спостерігалось по сульфатіазолу, а саме, у 28%. При застосуванні мультиметоду для вхідного контролю партій меду ми також виявили кілька зразків, позитивних по аналітах, що трапляються достатньо рідко у рутинній лабораторній практиці. Зокрема: зразок, що містив

5 мкг/кг доксицикліну, або такий, що одночасно містив 27 мкг/кг сульфадімідину, 3 мкг/кг сульфаметоксипіридазину та 4 мкг/кг триметоприму.

Таблиця 5

Аналіз результатів застосування методики УЕРХ-МС/МС визначення залишків антимікробних препаратів у зразках меду, проведеного в рамках договірної тематики на замовлення підприємств-експортерів за 2018-2019 рр.

Група залишків	Аналіт	LOD, мкг/кг	Кількість зразків				Макс. за- фіксовано, мкг/кг
			< LOD (%)	LOD - < MRPL*	MRPL* - 10 мкг/кг	< 10 мкг/кг	
Нітроїмідазоли	MTZ	0,1	481 (74)	140	16	11	> 17
Амфеніколи	CAP	0,05	364 (74)	76	50	4	>72
Метаболіти нітрофуранів	AOZ	0,1	144 (83)	5	2	0	2
	AMOZ	0,1	136 (100)	0	0	0	-
	AHD	0,15	136 (100)	0	0	0	-
	SEM	0,2	156 (90)	17	1	0	2
Сульфаніламіді** та триметоприм	SGD, SDZ, SMX, STZ, SMR, SMZ, SMP, SCP, SDM, TMP	0,2	9 (30)	14	3	6	> 1700
Тетрацикліни	TTC, OTC, CTC, DOX	0,5	12 (67)	3	2	1	> 200 (TTC)

Примітка: * – регуляторна межа, якщо немає встановленого значення MRPL;

** – результати подано стосовно сульфатіазолу.

Слід зазначити, що проаналізовані дані не претендують на високу репрезентативність, оскільки базуються на зразках меду безпосередньо від замовників, а не отриманих внаслідок моніторингу, шляхом випадкового вибору проб. Однак на основі отриманих результатів, чітко видно тенденцію щодо фактів неавторизованого чи некваліфікованого використання бджолярами антимікробних препаратів для лікування або профілактики хвороб бджіл. Виявлені у меді 200 мкг/кг тетрацикліну чи 1700 мкг/кг сульфатіазолу можуть вказувати на застосування препаратів під час медозбору.

За отриманими результатами можна зробити висновки, що сьогодні в Україні стратегія та контроль над використанням антимікробних препаратів у бджільництві поки не досягли необхідного рівня. Лікування бджіл інколи відбувається за схемами, розробленими ще до заборони застосування з цією метою антимікробних препаратів, ринок країни насичений контрабандною продукцією, або такою, яка де-юре дозволена (наприклад, ефірні олії), однак містить не задекларовані протимікробні препарати [17].

ВИСНОВКИ

За період 2018-2019 рр. з використанням розробленого нами УЕРХ-МС/МС мультиметоду визначення залишків різних груп антибіотиків та антимікробних препаратів у

меді, з 809 проаналізованих експортних партій меду за показниками безпеки всі виявилися відповідними. З 946 зразків меду, отриманих за договірними тематиками для проведення вхідного контролю сировини для підприємств, які займаються експортом українського меду на вміст залишків хлорамфеніколу, нітроїмідазолів, сульфаніламідів, тетрациклінів та метаболітів нітрофуранів, 68 % зразків не містили цільових аналітів на рівні, вищому за межу виявлення методу. Основними перевагами мультиметоду є простота, експресність, надійність, висока чутливість та економічна ефективність.

Перспективи досліджень. Модифікація процедури пробопідготовки зразків меду для УЕРХ-МС/МС мультиметоду визначення залишків антимікробних препаратів з метою включення нових груп аналітів, зокрема, макролідів та аміноглікозидів.

THE APPLICATION OF NEW UPLC-MS/MS MULTIMETHOD OF ANTIMICROBIALS RESIDUES DETERMINATION FOR THE CONTROL OF HONEY SAFETY

M. Rydchuk, S. Plotyca, D. Yanovych, Z. Zasadna, A. Zayarnyuk, O. Pazderska

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The article presents the results of the developed UPLC-MS/MS multimethod application for quantitative determination of different groups of antimicrobials residues in honey. According to the European RASFF system, despite the ban on the use of antimicrobials in beekeeping, there are still many reports of antibiotics detection in honey. Today there are no harmonized global requirements for honey safety, which are to be mandatory for honey exports and imports worldwide, and thus the instrumental abilities of the control laboratory (e.g., CC α and CC β) often are the main criteria of honey batches compliance. The development and use of multianalyte methods have obvious advantages, viz. shortened time of the analysis, reduced consumption of necessary consumables and reagents, the decrease of utilization time of laboratory equipment etc. Main advantages of our developed multimethod are the simplicity, rapidity and cost-effectiveness, since the analysis is performed in one sample preparation without the use of filtration or solid-phase extraction. This method provides selective determination of target analytes with LODs in the ranges from 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for chloramphenicol to 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for sulfanilamide and tetracycline; and it exceeds the requirements of the MRPLs or regulatory limits provided with a sufficient level of precision of the method and a high percentage of recoveries, which is in accordance with the requirements of Decision 2002/657/EC. The technique was tested in the analysis of natively contaminated and fortified honey samples, as well as in the interlaboratory studies.

During the period of 2018-2019, 809 export lots of honey were analyzed for safety, as well as 946 samples were tested during honey incoming control using our developed multimethod. The most frequently investigated analytes in honey were metronidazole and chloramphenicol, viz. 68% and 52% of the analyzed samples, respectively. This may be related to the risks of unauthorized use by apiaries of human medicine drugs as well as the counterfeit veterinary preparations containing these antibiotics, but which are not declared. With regard to chloramphenicol, the main reason for detecting its residues in honey today is the illegal use of preparations containing a mixture of chloramphenicol and its SS-para-stereoisomer dexamycine. The isomer has no therapeutic effect, but has repeatedly been found in counterfeit preparations for bees and, as a consequence, in honey.

It was found that among the samples for incoming honey control 297 contained target analytes at the level above the detection limit of the method. Most often, viz. in 28% of cases, the regulatory

limit (3 µg/kg) was exceeded for sulfathiazole, which may be used to treat and prevent American foulbrood, one of the most dangerous bee diseases. In few cases, the analyzed homogenized honey samples contained simultaneously five or six target analytes at concentration levels above their LOD. This clearly demonstrates the fact that Ukrainian beekeepers occasionally use unregistered antimicrobials for the treatment and/or prevention of bee diseases. The data obtained do not claim to be highly representative, since they are based on the analysis of honey samples directly from the customers and not obtained as a result of monitoring by random sampling.

Keywords: HONEY, INCOMING CONTROL, MULTIMETHOD, UPLC-MS/MS, DRUG RESIDUES.

ПРИМЕНЕНИЕ НОВОГО УЭЖХ-МС/МС МУЛЬТИМЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ БЕЗОПАСНОСТИ МЕДА

М. В. Ридчук, С. И. Плотиця, Д. В. Янович, З. С. Засадная, А. М. Заярнюк, О. М. Паздерская

Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты внедрения разработанного УЭЖХ-МС/МС мультиметода для количественного определения остатков различных групп антимикробных препаратов в меде. Основным преимуществом этого метода является простота, экспрессность и экономическая эффективность, поскольку анализ проводится по одной пробоподготовке. Методика апробирована при анализе нативно контаминированных и фортифицированных образцов меда, а также при проведении межлабораторных исследований. За период 2018-2019 гг. с использованием разработанного нами мультиметода были проанализированы 809 экспортных партий меда по показателям безопасности, а также 946 образцов – для входного контроля сырья. Чаще всего проводились исследования меда на содержание остатков метронидазола и хлорамфеникола, а именно – 68% и 52% анализируемых образцов, соответственно. Выявлено, что среди образцов входного контроля меда 297 содержали целевые аналиты на уровне выше предела обнаружения метода. Это четко свидетельствует об отдельных фактах использования украинскими пчеловодами незарегистрированных антимикробных препаратов для лечения и/или профилактики болезней пчел. Полученные данные не претендуют на высокую репрезентативность, поскольку базируются на анализе образцов меда непосредственно от заказчиков, а не полученные в результате мониторинга путем случайного отбора проб.

Ключевые слова: МЕД, ВХОДНОЙ КОНТРОЛЬ, МУЛЬТИМЕТОД, УЭЖХ-МС/МС, ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0110&from=EN>
2. *Genersch E.* American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae* // *J. Invertebr. Pathol.* – 2010. – V. 103. – P. 10-19.
3. *Genersch E.* Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 87. – P. 87-97.

4. *Webster T. C.* Nosema apis spore transmission among honey bees // *Am. Bee J.* – 1993. – V. 133. – P. 869-870.
5. Antimicrobials in beekeeping / *W. Reybroeck, E. Daeseleire, H.F. De Brabander, L. Herman* // *Veterinary Microbiology* – 2012. – V. 158. – P. 1-11.
6. <https://www.fda.gov>
7. <https://www.americanveterinarian.com>
8. <https://www.canadianveterinarians.net>
9. https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en
10. Multi-class determination of 27 antibiotics in honey / *R. Galarini, G. Saluti, D. Giusepponi et al.* // *Food Control* – 2015. – V. 48. – P. 12-24.
11. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / *Y. A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud et al.* // *J. Chromatography A* – 2008. – V. 1177. – P. 58-76.
12. *Alkan F.* Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofuran metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography – mass spectrometry / *F. Alkan, A. Kotan, N. Ozdemir* // *Mac. Vet. Rev.* – 2016. – V. 39 (1). – P. 15-22.
13. *Matus E.* Highly Selective Detection and Identification of Nitrofuran Metabolites in Honey Using LC-MS/MS / *E. Matus, J.-J. Dunyach, A. Albornoz* // *Thermo Fisher Scientific* – 2007. – Application Note 358. – AN62490_E 10/07S.
14. *Jenkins K. M.* LC/MS/MS Determination of Nitrofuran Metabolite Residues in Honey / *K. M. Jenkins, M. S. Young* // *Waters Corporation* – 2004. – Application Note 720001034EN.
15. Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey / *A. H. Shendy, M. A. Al-Ghobashy, S. A. Gad Alla, H. M. Lotfy* // *Food Chem.* – 2016. – V. 190. – P. 982-989.
16. Determination and Confirmation of Nitrofuran Residues in Honey Using LC-MS/MS / *M. I. Lopez, M. F. Feldlaufer, A. D. Williams, P.-S. Chu* // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55. – P. 1103-1108.
17. Порівняльний аналіз застосування методів скринінгу та підтвердження для визначення метронідазолу у зразках меду / *Д. В. Янович, О. І. Федякова, М. В. Ридчук, та ін.* // *НТБ ДНДКІ та Ін-ту біології тварин.* – 2018. – Вип. 19 (1). – С. 326-333.
18. A study of the origin of chloramphenicol isomers in honey / *D. Yanovych, B. Berendsen, Z. Zasadna et al.* // *Drug Testing and Analysis* – 2018. – V. 10 (2). – P. 416-422.
19. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey / *A. Kaufmann, S. Roth, B. Ryser, M. Widmer* // *J. AOAC International* – 2002. – V. 85 (4). – P. 853-860.
20. Analysis of Sulfonamide Residues in Real Honey Samples Using Liquid Chromatography with Fluorescence and Tandem Mass Spectrometry Detection / *A. Tölgyesi, R. Berky, K. Békési et al.* // *J. Liquid Chromatography and Related Technologies* – 2013. – V. 36. – P. 1105-1125.

References

1. <https://eurlex.europa.eu/legcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0110&from=EN>
2. *E. Genersch* American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae* // *J. Invertebr. Pathol.* – 2010. – V. 103. – P. 10-19.
3. *E. Genersch* Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 87. – P. 87-97.
4. *T. C. Webster* Nosema apis spore transmission among honey bees // *Am. Bee J.* – 1993. – V. 133. – P. 869-870.
5. *W. Reybroeck, E. Daeseleire, H.F. De Brabander, L. Herman* Antimicrobials in beekeeping // *Veterinary Microbiology* – 2012. – V. 158. – P. 1-11.

6. <https://www.fda.gov>
7. <https://www.americanveterinarian.com>
8. <https://www.canadianveterinarians.net>
9. https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en
10. R. Galarini, G. Saluti, D. Giusepponi, R. Rossi, S. Moretti Multiclass determination of 27 antibiotics in honey // *Food Control* – 2015. – V. 48. – P. 12-24.
11. Y.A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.H. LeBreton, P.A. Guy Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatography A* – 2008. – V. 1177. – P. 58-76.
12. F. Alkan, A. Kotan, N. Ozdemir Development and validation of confirmatory method for analysis of nitrofurantoin metabolites in milk, honey, poultry meat and fish by liquid chromatography – mass spectrometry // *Mac. Vet. Rev.* – 2016. – V. 39 (1). – P. 15-22.
13. E. Matus, J.-J. Dunyach, A. Albornoz Highly Selective Detection and Identification of Nitrofurantoin Metabolites in Honey Using LC-MS/MS // *Thermo Fisher Scientific* – 2007. – Application Note 358. – AN62490_E 10/07S.
14. K.M. Jenkins, M.S. Young LC/MS/MS Determination of Nitrofurantoin Metabolite Residues in Honey // *Waters Corporation* – 2004. – Application Note 720001034EN.
15. A.H. Shendy, M.A. Al-Ghobashy, S.A. Gad Alla, H.M. Lotfy Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey // *Food Chem.* – 2016. – V. 190. – P. 982-989.
16. M. I. Lopez, M.F. Feldlaufer, A.D. Williams, P.-S. Chu Determination and Confirmation of Nitrofurantoin Residues in Honey Using LC-MS/MS // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55. – P. 1103-1108.
17. Yanovych D. V., Fediakova O. I., Rydchuk M. V., Kislova S. M., Plotytsia S. I. Porivnial'nyi analiz zastosuvannya metodiv skryningu ta pidtverdzhennia dlia vyznachennia metronidazolu u zrazkakh medu // *NTB DNDKI ta In-tu biologii tvaryn.* – 2018. – Vyp. 19 (1). – S. 326-333 (in Ukrainian).
18. D. Yanovych, B. Berendsen, Z. Zasadna, M. Rydchuk, T. Czymai A study of the origin of chloramphenicol isomers in honey // *Drug Testing and Analysis* – 2018. – V. 10 (2). – P. 416-422.
19. A. Kaufmann, S. Roth, B. Ryser, M. Widmer Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey // *J. AOAC International* – 2002. – V. 85 (4). – P. 853-860.
20. A. Tölgyesi, R. Berky, K. Békési, S. Fekete, J. Fekete, V.K. Sharma Analysis of Sulfonamide Residues in Real Honey Samples Using Liquid Chromatography with Fluorescence and Tandem Mass Spectrometry Detection // *J. Liquid Chromatography and Related Technologies* – 2013. – V. 36. – P. 1105-1125.

Рецензент – Ю. М. Косенко, д. біол. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.