

Химия в ветеринарии

УДК 636.085:543.4/.5+637.047:543.4/.5

Проблемы аналитического контроля безопасности кормов и продукции животноводства

А. Н. Панин, А. А. Комаров

АЛЕКСАНДР НИКОЛАЕВИЧ ПАНИН — доктор ветеринарных наук, академик РАСХН, профессор, директор Всероссийского государственного Центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ ВГНКИ). Область научных интересов: обоснование новых концептуальных подходов обеспечения качества и безопасности кормов и продукции животного происхождения.

АЛЕКСАНДР АНАТОЛЬЕВИЧ КОМАРОВ — кандидат биологических наук, профессор Международной Промышленной Академии, заведующий отделом кормов и кормовых добавок ФГУ ВГНКИ. Область научных интересов: применение иммунохимических, хроматографических и масс-спектрометрических методов для определения остаточных количеств лекарственных средств, ксенобиотиков техногенного и биологического происхождения в кормах и продукции животноводства.

123022 Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, ФГУ ВГНКИ, тел. (095)253-14-91, факс (095)256-03-81, E-mail Vgnki-vet@mtu-net.ru, alex.kom.pet@mtu-net.ru

Безопасность продовольствия — одна из основных составляющих обеспечения безопасности государства. Глобализация торговли животными и продовольствием превратила безопасность пищевых продуктов в международную проблему. Последние «продовольственные скандалы»: губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, гибель людей в результате контаминации Шотландской говядины токсинами *E.coli O157*, диоксиновый кризис в Бельгии и др. — подорвали доверие потребителей к обеспечению безопасности и качества продовольствия [1].

Традиционная система контроля, заключающаяся в исследовании образцов пищевых продуктов и инспектировании перерабатывающих и торговых предприятий, сегодня не способна решать постоянно возникающие проблемы в области безопасности продовольствия, поскольку в ней не принимаются во внимание профилактические аспекты.

В настоящее время повышенное внимание должно уделяться профилактическим мерам, основанным на выявлении и ликвидации потенциальных опасностей на всех стадиях производства. В этой связи особую важность приобретает интеграция производства кормов, выращивания, перевозки, уоя животных, переработки, хранения, расфасовки и продажи продукции животноводства в единую систему обеспечения качества, связывающую все звенья цепочки производства пищевых продуктов от откорма животных до момента, когда пища окажется на столе потребителя.

Несмотря на то что ответственность за производство и выпуск на рынок безопасного продовольствия лежит на производителях, защита здоровья потребителя всегда останется в ведении государства. Государственные ветеринарные службы должны быть полностью готовы к выполнению новых требований международных организаций (Всемирной организации здравоохранения, Кодекса Алиментарии, Международного эпизоотического бюро, Всемирной торговой организации) и руководствоваться в своей работе научным подходом, основанным на должной оценке рисков. Для

эффективного выполнения поставленных перед ней задач ветеринарная служба нуждается в сведениях, которые в полном объеме может дать только национальная программа мониторинга за содержанием остаточных количеств лекарственных средств для животных, ксенобиотиков техногенного и биологического происхождения в продукции животноводства и в кормах.

В странах Европейского Союза (ЕС) в соответствии с директивой 96/23/ЕС регулярно проводится мониторинг остаточного содержания в кормах и животноводческой продукции запрещенных анаболических стимуляторов роста (стильбенов, тиреостатиков, стероидов, лактонов резорциловой кислоты, бета-адренормиметиков), отнесенных к группе А, а также препаратов группы В: лекарственных средств для животных (антибактериальных, антигельминтных, кокцидиостатиков, пиретроидов, нестероидных противовоспалительных препаратов и др.), загрязнителей техногенного происхождения (хлорорганических и фосфорорганических пестицидов, полихлорированных бифенилов, диоксинов, тяжелых металлов), микотоксинов и других веществ [2]. Причем, если при контроле препаратов группы А основной целью является обнаружение незаконного использования их в любых концентрациях, то при определении веществ из группы В необходимо ориентироваться на максимально-допустимые уровни их в кормах и продукции животноводства. Россия после вступления в ВТО должна будет ежегодно осуществлять подобный мониторинг на своей территории. Это требует создания материально-технической базы, разработки, метрологической аттестации и утверждения комплекса скрининговых отборочных и подтверждающих методов контроля.

Неотъемлемая часть интенсивного животноводства — использование лекарственных средств в ветеринарии, что обуславливает потенциальную возможность присутствия остаточных количеств этих препаратов в животноводческой продукции и необходимость контроля за их содержанием.

Большая часть этих препаратов (антибиотики, кокцидиостатики, стимуляторы роста животных и др.) применяется с комбикормами. Загрязнение комбикормов лекарственными препаратами происходит из-за ряда факторов: человеческих ошибок, перекрестного загрязнения в процессе производства лечебных и серийных комбикормов на одном и том же технологическом оборудовании (из-за электростатических сил и «мертвого» объема оборудования), загрязнение в процессе транспортировки и непосредственно в хозяйствах.

При загрязнении комбикормов и премиксов лекарственными препаратами возникают две основные проблемы: токсичность для животных и остатки препаратов в продукции животноводства.

Токсичность загрязненных лекарственными препаратами комбикормов обусловлена различной видовой чувствительностью животных к тем или иным препаратам. Наибольшее количество случаев токсичности связано с широким использованием ионофорных антибиотиков в качестве эффективного средства борьбы с кокцидиозом у птиц. Так, ионофоры в терапевтических дозах для птицы (120 мг/кг) вызывают отравления у чувствительных животных (для лошадей, крупного рогатого скота, верблюдов, собак максимальная переносимая доза 33 мг/кг) с развитием кардиомиопатии [3].

Главная опасность загрязнения комбикормов лекарственными препаратами — получение животноводческой продукции, загрязненной остаточным содержанием лекарственных веществ. Мониторинговые исследования, проведенные в Северной Ирландии, показали, что в 44% исследованных кормов были обнаружены антимикробные препараты, хотя производитель декларировал их отсутствие. При мониторинге комбикормов, содержащих лекарственные препараты, в 35% из них дополнительно содержались незадекларированные препараты. Наиболее часто выявляли загрязнение кормов хлортетрациклином (в 15% случаев), сульфаниламидами (6,9%), пенициллином (3,4%), ионофорами (3,4%) [3].

Для предотвращения подобного загрязнения можно использовать отдельные технологические линии для производства комбикормов и премиксов с лекарственными препаратами и применять гранулированные лечебные премиксы, что существенно уменьшает проблему электростатических сил.

Для надежного гарантированного качества и безопасности продуктов питания необходимо контролировать правильность применения лекарственных препаратов с кормами и определять остаточное содержание лекарственных веществ в органах и тканях животных.

Анаболические агенты — соединения, которые стимулируют синтез белка и увеличивают мышечную массу. Применение анаболиков для сельскохозяйственных животных приводит к увеличению убойной массы и улучшению конверсии корма, что обуславливает использование этих веществ в современном животноводстве ряда стран, в частности США и Канады.

Использование анаболиков в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных запрещено в странах Европейского Союза и Российской Федерации. При использовании анаболиков в животноводстве риск воздействия остаточных количеств этих веществ на здоровье потребителей — главная опасность, вызывающая беспокойство. Имеющиеся опасения основаны на все увеличивающейся информации об уязвимости эндокринного равновесия на разных стадиях,

а также о потенциальной генотоксичности этих соединений и их метаболитов. Воздействие экзогенных гормонов может нарушить это тонкое равновесие, что подтверждается выраженным влиянием эстрогенов и андрогенов на гормональный импринтинг. Следует учитывать также второстепенные риски, поскольку назначение гормонов продуктивным животным вызывает изменение распределения и выделения ксенобиотических соединений (антибиотиков и других лекарственных препаратов) [4].

В монографиях Международного агентства по исследованию рака (IARC) приведена оценка потенциальной канцерогенности гормонов. Диэтилстильбэстрол (первый признанный трансплацентарный канцероген для людей), нестероидные и стероидные эстрогены и тамиксифен были отнесены к группе 1 — признанных канцерогенов для человека. В группы 2А и 2В — предположительные канцерогены для человека — вошли андрогенные анаболические стероиды, мед-роксипрогестерон ацетат и другие прогестины [5].

β-Агонисты (β-адреномиметики) синтезированы из эндогенного катехоламина — адреналина. Они обладают большей β-селективностью и менее подвержены метаболической деградации, чем адреналин. Хотя β-агонисты не являются стероидными гормонами, по действию их можно сравнить со стероидами. Эти вещества при пероральном применении с кормами обладают сильным антикатаболическим и жиросжигающим действием и способствуют увеличению мышечной массы, что приводит к получению постного мяса, пользующегося большим спросом на потребительском рынке.

Главные побочные эффекты β-агонистов: нарушение сердечного ритма (тахикардия), мышечный тремор, гипокалиемия, тахифилаксия, чувство беспокойства, головные боли, усиленная потливость, сонливость, мышечные спазмы, повышение давления, тошнота. Все это делает особенно опасным потребление мяса животных, получавших β-агонисты, для людей с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Начиная с 1990 г., в специальной литературе описано множество случаев отравления людей мясом и говяжьими субпродуктами, содержащими остаточные количества β-агонистов [6].

Запрещение использования анаболиков в Европе вызвало хорошо организованное противодействие со стороны незаконных пользователей препаратов этой группы. Их применение в последние годы развивалось по следующим направлениям, существенно затрудняющим обнаружение в кормах и продукции животноводства:

— использование природных гормонов, труднее обнаруживаемых на фоне больших колебаний их содержания у животных различных видов и возрастов в разные физиологические периоды;

— применение новых синтетических анаболиков (например, станозола), обладающих более выраженным анаболическим эффектом в низких дозах и трудно определяемых из-за большого количества метаболитов;

— использование очень низких доз гормонов в составе гормональных «коктейлей» за счет синергических эффектов (например, совместное применение кортикостероидов и β-агонистов);

— применение синтетических производных уже известных анаболиков, что не позволяет выявлять их иммунохимическими методами;

— применение новых, неизвестных ранее препаратов.

Проблема выявления незаконного применения новых препаратов очень сложна особенно на первом этапе, когда лабораториям недоступны их стандартные образцы. В этом случае, наряду с масс-спектрометрией, для расшифровки их структуры применяется метод ядерного магнитного резонанса. В последние годы в Европе идентифицированы следующие новые анаболические стероиды: флюгестон ацетат, аллилстренол и норкlostеболацетат.

Одна из наиболее сложных задач — определение экистероидов. Более 150 экистероидов было идентифицировано в составе растений и беспозвоночных. Из-за большого количества спиртовых и кето-групп в молекулах, экистероиды сложно анализировать хроматографическими методами и очень трудно дифференцировать источник экистероидов в мясе: растительные корма или преднамеренное применение анаболиков [7].

В 1990-е гг. методология анализа остаточного содержания ксенобиотиков ушла далеко вперед. Помимо успехов, связанных с развитием оборудования для анализа и компьютеризации, прогресс затронул все стадии аналитического процесса. В значительной степени мы обязаны этим успехам повышению чувствительности и специфичности методов определения, которые, с одной стороны, способствовали миниатюризации процедур, а с другой стороны, позволили снизить требования к чрезмерно трудоемким процедурам очистки и разделения веществ, определяемых при анализе.

В 1970-х и начале 1980-х годов в типовой лаборатории, специализирующейся на анализе остаточных количеств ксенобиотиков, для экстракции аналитов использовали большие объемы органических растворителей посредством разделения жидких фаз в делительной воронке или методом открытой колоночной хроматографии. Для концентрирования таких объемов растворителей применялись роторные испарители. Хотя перечисленные методы по-прежнему применяются в некоторых отраслях анализа, а именно, при определении диоксинов, в большинстве областей анализа эти методы вытеснены микрометодами, основанными на технологии твердофазной экстракции (ТФЭ) в специальных картриджах. Значительно меньшие объемы растворителей выпаривают в нагревательных камерах в атмосфере азота или в специальных приборах для выпаривания, например, в центрифужных испарителях. Использование иммуноаффинных сорбентов и технологии молекулярного импринтинга сделали возможным осуществление одноэтапной селективной очистки анализируемых веществ из нативных экстрактов [8].

Любой анализ начинается с отбора образцов. В процесс отбора образцов всегда входит элемент экспертизы, однако существует несколько фундаментальных представлений. Прежде всего, отобранный образец должен быть достаточно представительным по отношению к партии продукции, от которой он отобран, а также должна быть представительной средняя аналитическая проба, полученная из исходного образца в лаборатории.

Например, известно, что микотоксины часто крайне неравномерно распределены в партии продукта, поэтому очень сложно получить представительный образец от партии продукта для их определения. В связи с этим, для того чтобы обеспечить представительность образца, он должен быть достаточно боль-

шим, для чего необходимо отбирать много точечных проб из различных мест партии продукции. Объем средней пробы от партии арахиса может достигать при этом 20–30 кг [9].

Другие важные соображения, касающиеся отбора образцов, также связаны с распределением химических соединений в различных тканях и жидкостях организма и особенностями их метаболизма. При этом, для идентификации запрещенных веществ (стероидов, стильбенов, β -агонистов, тиреостатиков и др.) основное внимание следует придавать их обнаружению в любых органах, физиологических жидкостях и экскрементах, а не установлению точного содержания в съедобных тканях. Так эффективность контроля за незаконным применением β -агонистов существенно возросла после того как было обнаружено, что они накапливаются и долго удерживаются в тканях, содержащих меланин, например, сетчатке глаз. Поскольку меланин присутствует в больших количествах в шерсти, были разработаны методы, позволяющие использовать шерсть животных в качестве образца для мониторинга за использованием соединений этой группы [6].

Для разрешенных соединений (лекарственных средств, пестицидов и др.), наоборот, важное значение имеет их остаточное содержание в различных органах и тканях, поскольку необходимо убедиться, что оно не превышает установленных максимально допустимых уровней (МДУ). Например, обнаружено, что концентрация стрептомицина и хлортетрациклина в корковом слое почек выше, чем в мозговом, тогда как в отношении распределения кленбутерола ситуация оказалась противоположной [8].

Результаты анализа во многом зависят от обеспечения сохранности образца с момента отбора до проведения анализа, поэтому большое значение имеют условия его упаковки, транспортировки и хранения. В ряде исследований были приведены данные о нестабильности некоторых соединений даже при хранении образцов в замороженном состоянии при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Этот феномен был, в частности, доказан при определении остаточного содержания сульфаметазина и сульфадимидина в тканях [10]. Исследование стабильности кленбутерола в печени при хранении образцов в замороженном состоянии при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ показало, что гомогенизация образцов перед хранением приводит к снижению остаточного содержания кленбутерола в матрице, по сравнению с содержанием при хранении в интактном образце печени. Исчезновение пенициллина G из молока объясняется присутствием в нем бактериального фермента β -лактамазы. Быстрой деградации в животных тканях *post-mortem* подвергается фуразолидон. Хлорамфеникол в печени подвергается быстрой деградации даже при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ вследствие превращений, опосредованных цитохромом P-450. Эффективным ингибитором этого процесса является пиперонил бурооксид, который можно использовать при длительном хранении образцов [8].

При определении остаточного содержания ксенобиотиков необходимо учитывать особенности метаболизма этих соединений в физиологических жидкостях, органах и тканях животных. Пути метаболизма этих соединений в организме животных очень разнообразны: окисление, восстановление, гидролиз, гидратация, конъюгация и конденсация. Интенсивность и дли-

тельность воздействия ксенобиотиков на организм, а также остаточное содержание исходных соединений и их метаболитов в продукции животноводства зависят от скорости абсорбции, распределения, биотрансформации и выведения этих веществ. Печень — главный орган, участвующий в метаболизме ксенобиотиков, но, наряду с ней, в общем метаболизме принимают участие: почки, легкие, кишечник и кожа. Реакции биотрансформации разделяют на две фазы: функциональные реакции и реакции конъюгации. Во второй фазе биотрансформации исходное вещество или метаболит первой фазы соединяется с эндогенными молекулами глутатиона, глюкуроновой кислоты, жирной кислоты или аминокислоты. Общей целью конъюгации ксенобиотиков является увеличение их растворимости в воде для выделения из организма с желчью или мочой. Биотрансформация веществ может зависеть от вида, возраста, пола и физиологического статуса животного.

При доказательстве незаконного применения гормонов часто довольно эффективным оказывается определение общих метаболитов различных материнских стероидов. Использование этого подхода дает два основных преимущества: возможность более длительного обнаружения метаболитов в тканях и физиологических жидкостях животных по сравнению с материнскими предшественниками и определение в процессе одного анализа общих метаболитов для контроля незаконного применения большого количества материнских стероидов. Например, наиболее эффективным способом доказательства применения тестостерона в качестве допинга для спортивных лошадей, является определение увеличенного соотношения тестостерон/эпитестостерон. Показано, что 17α -этил- 5β -эстран- $3\alpha,17\beta$ -диол является общим метаболитом нортандролон и этилстренола, а 17α -метил- 5β -андростан- $3\alpha,17\beta$ -диол (МеАД) — 17α -метилстероидов (метилтестостерона, метилболденон и метандриола). При этом МеАД более длительное время обнаруживается в моче и фекалиях, по сравнению с материнскими стероидами [11].

В 1999 г. в Бельгии при проверке 2895 образцов мочи, отобранных на фермах, в 308 были обнаружены анаболические стероиды, в 302 из которых — 16β -гидроксистеранозол — главный метаболит станозола. Определение этого метаболита проводить предпочтительнее, так как он обнаруживается в моче бычков в течение 17 дней после применения станозола, тогда как родительский компонент — только 5 дней [12].

В последние годы стало очевидным, что некоторые, как ранее считалось, экзогенные стероиды, могут синтезироваться эндогенно. Так, главный метаболит 17β -нортестостерона, 17α -нортестостерон, был обнаружен в моче стельных коров и овец во второй половине беременности, а также у жеребцов, хряков и баранов. В моче быков обнаружен метаболит 17β -болденон — 17α -болденон [12].

Зеранол (α -зеараланол) — это синтетический промотор роста с эстрогенной активностью. Позднее было доказано, что зеранол может также образовываться *in vivo* из микотоксинов зеараленон и α -зеараленола, продуцируемых микроскопическими грибами рода *Fusarium*. Обнаружение зеранола в моче не может служить однозначным доказательством применения этого

гормона в качестве стимулятора роста. Тем не менее, одновременное определение зеараленон, α -зеараленола, β -зеараленола, β -зеараланола и измерение соотношения α -зеараленола/ α -зеараланола позволяет дифференцировать применение гормона зеранола от природного загрязнителя — микотоксина зеараленон [13].

Учитывая, что значительная часть ксенобиотиков и их метаболитов в определенных условиях может находиться в конъюгированном состоянии, подготовка образцов к анализу обычно включает этап гидролиза конъюгатов. Наиболее часто для этих целей применяется ферментативный гидролиз с использованием сока *Helix Pomatia*, обладающего как глюкуронидазной, так и арилсульфатазной активностями. Как альтернатива, используется глюкуронидаза, полученная из *E.coli*, в комбинации с сольволизом для гидролиза сульфатов. Следует особо отметить, что неполная деконъюгация часто является одним из основных источников ошибок при проведении количественного анализа остаточного содержания лекарственных препаратов. Наилучший способ, позволяющий гарантировать адекватные условия гидролиза, заключается в построении кинетических кривых для различных условий (рН, температуры, времени гидролиза и др.) [14].

Другим примером применения ферментов для увеличения степени извлечения остаточных количеств ксенобиотиков из органов и тканей животных является использование протеолитических ферментов. Чаще всего для этих целей применяется субтилизин, хотя в некоторых случаях предлагается использовать проназу [15].

Среди методов очистки аналита самым старым является классическая жидкостная экстракция. Этот способ экстракции достаточно трудоемок. Кроме того, жидкостная экстракция — это дорогостоящая процедура, поскольку часто требует больших объемов органических растворителей и длительных этапов выпаривания растворителей. Следует учитывать и тот факт, что органические растворители являются опасными загрязнителями окружающей среды.

В последние годы все более широкое применение находят современные методы экстракции, концентрирования и очистки аналита: твердофазная экстракция на патронах с прямой, обращенной и смешанными фазами, адсорбционная хроматография, иммуноаффинная хроматография, твердофазное диспергирование, сверхкритическая жидкостная экстракция, ускоренная экстракция под давлением [8, 14, 16–18].

Стратегия контроля остаточного содержания лекарственных средств в кормах и животноводческой продукции в ЕС включает использование скриннинговых и подтверждающих методов. Комитет Кодекса Алиментарис по изучению остаточных количеств ветеринарных препаратов в пищевых продуктах определяет эти методы как методы I, II и III уровней [19]. Методы III уровня — это качественные или полуколичественные методы, используемые для быстрого скриннинга большого количества образцов на первом этапе, чтобы идентифицировать те из них, которые, возможно, не соответствуют требованиям и нуждаются в дальнейшем изучении. Скриннинговые методы II уровня позволяют проводить количественную оценку определенного аналита, присутствующего в образце, но не позволяют однозначно идентифицировать этот аналит. Подтверждающие методы I уровня позволяют однозначно идентифицировать аналит.

Для признания результатов, полученных с помощью того или иного метода, международными организациями необходимо, чтобы он прошел аттестацию в соответствии с гармонизированным протоколом ISO/IUPAC/-АОАС [20]. Для аттестации скрининговых методов III уровня в соответствии с этими требованиями необходимо участие 15 лабораторий, которые должны представить сведения об изучении аналита на 2 уровнях для каждой матрицы, 5 образцов для каждого уровня и 5 отрицательных контрольных образцов для каждой матрицы. В случае скрининговых методов II уровня требуется исследование не менее 5 материалов в 8 лабораториях и проведение повторных испытаний шифрованных образцов. В случае подтверждающих методов I уровня, когда речь идет о методах, требующих специальной подготовки и дорогостоящего оборудования (например, масс-спектрометрии), которое может быть доступно лишь для небольшого числа лабораторий, минимальное количество лабораторий, необходимых для межлабораторных испытаний, может быть снижено до 5. Однако из-за ограниченного количества экспертных лабораторий, которые могут принять участие в таких испытаниях, высокой их стоимости и разнообразия комбинаций матриц и концентраций аналитов, подлежащих анализу, такие испытания не позволяют разработать достаточного количества аттестованных методов. Сталкиваясь с реальными условиями, регулирующие организации национального уровня ищут альтернативные пути для решения данной проблемы.

Основной подход регулирующих организаций США заключается в проведении аттестации с участием нескольких лабораторий с тем, чтобы установить параметры эффективности методов и продемонстрировать возможность применения этих методов в разных лабораториях. Например, если речь идет о методах определения остаточного содержания лекарственных средств в органах и тканях животных, требуется провести исследование с участием 3 лабораторий, чтобы продемонстрировать надежность метода при применении его для определения остаточного содержания аналита в заявленных матрицах на уровне 0,5, 1 и 2 МДУ. Должна быть выполнена оценка точности, применимости, устойчивости, чувствительности и аналитического диапазона метода. При этом эффективность метода должна соответствовать параметрам, приведенным в таблице 1. Такие исследования проводятся под контролем Федерального агентства по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами (FDA).

Параметры эффективности для методов анализа, используемых в регулирующих программах ФАО* [19]

Концентрация, мкг/кг	Коэффициент вариации, %	Точность (допустимый диапазон), %	Извлечение, %
≤ 1	35	от -50 до +20	не указано
> 1 ≤ 10	30	от -40 до +20	от 60 до 120
> 10 ≤ 100	20	от -30 до +10	от 70 до 110
> 100	15	от -20 до +10	от 80 до 110

* Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

В странах Европейского Союза принят альтернативный подход, в основу которого положена аттестация методов в пределах лаборатории с использованием единых стандартов эффективности, внутренних процедур контроля качества результатов анализа и сертифицированных стандартных образцов. Требования к методам, используемым для определения остаточного содержания ксенобиотиков изложены в Решении Комиссии 2002/657/ЕС. В таблицах 2 и 3 приведены минимальные требования к правильности и воспроизводимости для количественных методов анализа [21]. Достоинством подхода, принятого в странах ЕС, является возможность более быстрого реагирования на внедрение новых технологий анализа и современного оборудования, по сравнению с ситуацией, когда законодательно закреплены официальные методы определения для каждого аналита.

Таблица 2

Минимальные требования к правильности для количественных методов анализа в соответствии с Решением Комиссии 2002/657/ЕС [21]

Концентрация, мкг/кг	Диапазон, %
≤ 1	от -50 до +20
> 1 < 10	от -30 до +10
≥ 10	от -20 до +10

Таблица 3

Воспроизводимость количественных методов анализа в соответствии с Решением Комиссии 2002/657/ЕС [21]

Концентрация, мкг/кг	Воспроизводимость (CV), %
1	*
10	*
100	23
1000	16

* Величины CV для концентраций ниже, чем 100 мкг/кг должны быть такими малыми, как только возможно

В Российской Федерации аттестация может осуществляться как с участием нескольких лабораторий, так и в пределах одной лаборатории.

При определении остаточного содержания ксенобиотиков в продуктах питания и кормах скрининговые технологии являются тем бесценным инструментом, который позволяет провести быструю проверку большого числа образцов в течение короткого времени. Скрининговые методы должны удовлетворять следующим основным критериям: обладать высокой специфичностью и производительностью при относительно низкой себестоимости; уровень ложноотрицательных результатов должен быть минимальным (≤ 5% в соответствии с Решением Комиссии 2002/657/ЕС); необходимо установить точность и прецизионность метода; предел обнаружения должен быть достаточным для определения аналита на уровне МДУ [21].

Важная разновидность скрининговых методов — экспресс-тесты, используемые непосредственно на фермах и мясопере-

рабатывающих предприятиях. Они представляют специфический тип скрининговых методов, которые дают очень быстрый положительный или отрицательный результаты. Это могут быть: иммунологический дот-анализ, простые хроматографические методы, органолептические анализы, микробиологические тесты, морфологические методы и др.

Для определения остаточного содержания антибиотиков разработаны многочисленные разновидности микробиологических тестов, основанные на способности антибиотиков подавлять рост тест-штаммов микроорганизмов. Присутствие остаточных количеств антибиотиков идентифицируют путем измерения диаметра зоны подавления роста контрольных микроорганизмов, или по изменению окраски среды, в которую добавлен индикатор, как в случае «Delvotest» для определения антибиотиков в молоке и «Premi®Test» — в мясе [22, 23].

Быстрое определение сульфаниламидов в моче в «Sulpha-on-Site (SOS)» тесте основано на применении тонкослойной хроматографии (ТСХ). Использование твердофазного диспергирования для предварительной очистки пробы позволило определять этим методом сульфаниламиды в органах и тканях животных [24].

Иногда для экспресс-тестов используют изменения в биологических, физиологических или гистологических процессах. Примером последних является исследование морфологических изменений в железистой ткани простаты как показатель использования эстрогенных препаратов. О длительном применении β -агонистов может свидетельствовать расширение трахеи, уменьшение и уплощение ее гребня. Разработан экспресс-метод определения β -агонистов в моче, основанный на расслаблении гладкой мускулатуры в изолированных полосках трахеи. Такое расслабление вызывается активацией β_2 -адренорецепторов при воздействии на полоски трахеи мочой, содержащей остаточные количества β -агонистов [8].

При первичном скрининге остаточного содержания ксенобиотиков в продуктах питания и кормах наиболее широкое применение нашли иммунохимические методы, в первую очередь, иммуноферментный и радиоиммунный анализ [8, 14, 25—27].

Хотя в последние годы быстро развиваются различные методы рецепторного анализа и биосенсоры, эти технологии еще достаточно дороги [28, 29].

Самым важным компонентом иммунохимического анализа являются антитела. Несмотря на то, что в последнее время все более широкое распространение

получают моноклональные и рекомбинантные антитела, при определении остаточного содержания ксенобиотиков чаще всего используют поликлональные антитела, так как они, как правило, обеспечивают наиболее высокую чувствительность анализа.

Низкомолекулярные органические вещества, которыми является большинство ксенобиотиков, не обладают достаточной иммуногенностью, поэтому для получения специфических антител их ковалентной связью присоединяют к высокомолекулярному белку-носителю в качестве гаптенов. Характер такой связи непосредственно влияет на свойства получаемых антител. Чем меньше изменений происходит в трехмерной пространственной конформации гаптена в результате связывания, тем выше шансы получить высококачественные антитела [27].

Для определения стероидных гормонов в качестве гаптенов чаще всего используют оксимы по карбонильной группе в положении 3 и карбоксипроизводные по гидроксильной группе в 17-ом положении, которые ковалентно пришивают к белку-носителю пептидной связью с помощью метода смешанных ангидридов или карбодиимидного метода. Впервые такой подход был успешно реализован в 70-е годы прошлого века для определения 17α -метил-, 17α -этил- и 19 -норанаболических стероидов, используемых в качестве допинга в спорте (рис. 1). Очевидно, что места связывания гаптенов с молекулой-носителем выбраны максимально удаленно от участка распознавания, отмеченного на рисунке стрелкой, что позволило получить высокоспецифичные антитела [25].

Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) успешно применяется для обнаружения β -агонистов [26]. Для получения специфических антител конъюгат кленбутерола с белком-носителем синтезировали методом diazotирования, основанным на конденсации диазосоединения исходного ароматического амина с остатками тирозина в молекуле белка (рис. 2).

В последние годы в России разработаны оригинальные способы синтеза карбоксипроизводных стильбенов, синтетических анаболических стероидов и созданы тест-системы для определения остаточного содержания кленбутерола, диэтилстильбестрола, нор-тестостерона, метилтестостерона, тренболон и этилэстрадиола в кормах и продукции животноводства методом конкурентного твердофазного ИФА [30—34].

Учитывая, что микробиологические методы, широко используемые для скрининг-определения остаточного содержания антибиотиков в органах и тканях

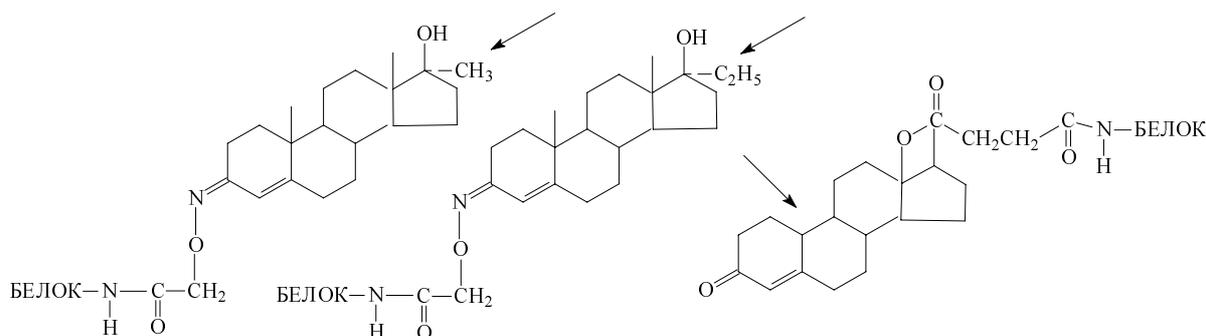


Рис. 1. Структура конъюгатов 17α -метил-, 17α -этил- и 19 -нортестостерона с белками [25]

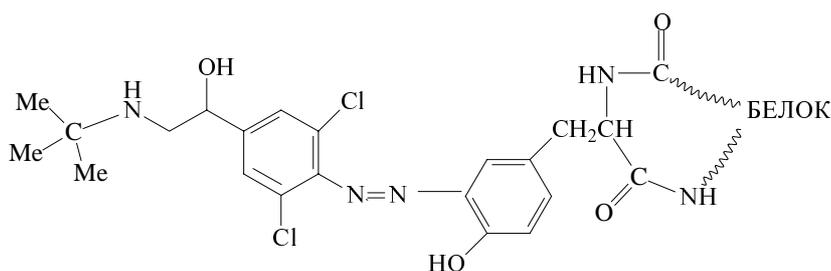


Рис. 2. Структура конъюгата кленбутерола с белком, полученного методом диазотирования [26]

животных, высокочувствительны к пеницилинам, но недостаточно чувствительны к сульфаниламидам и тетрациклинам, для определения последних перспективно применять иммунохимические методы [35].

Чаще всего для твердофазного ИФА используются микропланшеты. Однако необходимость проведения быстрого скрининга на фермах и мясоперерабатывающих предприятиях привела к созданию пробирочных экспресс-тестов или стрип-тестов ИФА.

В последние годы в качестве меток для обнаружения иммунохимических реакций все чаще используются коллоидные частицы золота. Макромолекулы иммуноглобулинов могут адсорбироваться на коллоидных частицах золота, что используется для прямой визуализации антигенов. Стрип-системы, основанные на использовании частиц коллоидного золота, представляют собой одноэтапный анализ (все реагенты сорбированы на тестовой полоске) и требуют очень мало времени (около 5 минут). Другим преимуществом таких систем является возможность одновременного проведения нескольких тестов в одной и той же системе. Однако в связи с необходимостью использования большего количества реагентов для ускорения процесса, чувствительность стрип-тестов оказывается существенно ниже, чем микропланшетного ИФА [15].

Для того чтобы воспользоваться всеми преимуществами, которые предоставляет простота проведения скрининговых анализов, необходимо разработать столь же простые способы подготовки образцов. Так как методы иммуноанализа являются чрезвычайно чувствительными, вместо сложной очистки образца часто может применяться простое разведение экстракта. Если разведения тестируемого образца с известным количеством внесенного аналита не параллельны стандартной калибровочной кривой, можно говорить о разнице в сродстве к антителам, которая характерна для матричных эффектов. Характер таких помех зависит от ряда факторов, и в каждом конкретном случае необходимо проводить изучение влияния этих факторов и разрабатывать оптимальный способ экстракции и очистки аналита для конкретной матрицы. При этом необходимо обязательно подтверждать положительные результаты, полученные методами иммуноанализа, другими химическими методами [36].

К подтверждающим методам определения остаточного содержания ксенобиотиков предъявляются строгие требования: достаточная специфичность для обеспечения однозначной идентификации аналита, точность и прецизионность метода должны соответствовать установленным критериям, а предел обнаруже-

ния, предел определения и чувствительность метода обеспечивать его пригодность для решения конкретных задач. Если для аналита установлен максимально допустимый уровень в конкретных матрицах, величина предела определения этого соединения плюс три стандартных отклонения не должна превышать МДУ. В отношении запрещенных веществ предел обнаружения метода должен обеспечивать достоверное обнаружение ожидаемого остаточного содержания при доверительной вероятности $P = 0,95$ [8].

До недавнего времени, большинство подтверждающих методов определения остаточных количеств лекарственных средств было основано на сочетании двух или нескольких методов, обеспечивающих дополнительные гарантии при идентификации аналита. Примером таких методов является «иммунограмма», когда искомые соединения после разделения высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) количественно определяют иммунохимическими методами (радиоиммунный анализ (РИА), ИФА), что позволяет совместить относительно высокую эффективность хроматографического разделения с чувствительностью определения, характерной для иммунохимических методов [13].

В последние годы предпочтение отдается молекулярно-спектрометрическим подтверждающим методам определения анаболиков, позволяющим проводить прямую идентификацию аналита. Идеальным подтверждающим методом является хромато-масс-спектрометрия, сочетающая хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием, особенно в режиме тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), значительно снижающей требования к предварительной очистке пробы и позволяющей повысить специфичность метода [37].

Анализ ксенобиотиков методом газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) часто требует дериватизации (химической модификации молекул аналита до определения). Основной целью такой модификации является обеспечение анализа соединений, которые обладают плохой летучестью и низкой стабильностью при повышенных температурах. Высокая температура испарения веществ обусловлена наличием сильного межмолекулярного взаимодействия, возникающего между полярными функциональными группами. Так NH-, OH- и SH-группы в молекуле аналита могут образовывать водородные связи с другими полярными компонентами, что приводит к снижению летучести соединения, а также с активными центрами неподвижной фазы, что снижает разрешающую способность хроматографической колонки. Замещение реакционно активных атомов водорода алкильными, ацильными или силильными группами приводит к снижению температуры кипения анализируемого соединения. В то же время, низкомолекулярные аминопериодические производные могут обладать слишком высокой летучестью и не удерживаются в хроматографической колонке в течение времени, требуемого для анализа. Дериватизация таких веществ позволяет повысить их температуру кипения и увеличить время удерживания

на колонке. Часто дериватизация приводит к образованию ионных фрагментов большей массы, которые позволяют увеличить надежность идентификации соединений и упростить количественный анализ следовых концентраций веществ [8, 38, 39].

Все способы дериватизации можно условно разделить на 4 основные группы: алкилирование, ацилирование, силилирование и конденсация. При определении остаточного содержания лекарственных средств в продукции животноводства методом ГХ-МС наиболее широко применяется силилирование, заключающееся во введении силильной группы в молекулу соединения путем замещения подвижных атомов водорода. Основными используемыми реагентами при этом являются производные триметилсилана ($(\text{CH}_3)_3\text{SiH}$ (ТМС); гексаметилдисилазан (ГМДС), N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (БСТФА), триметилхлорсилан (ТМХС), триметилиодсилан (ТМИС), N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамид (МСТФА) и N-триметилсилилимидазол (ТМСИ). Механизм реакции заключается в нуклеофильной атаке реакционно центра молекулы более электроотрицательным атомом кремнийсодержащего реагента. Причем если для получения триметилсилиловых эфиров веществ, содержащих фенольную или пространственно затрудненную спиртовую группу (стильбенон, эстрадиола и др.), достаточно использовать МСТФА, триметилсилиловые эфиры по кетогруппе, способной к енолизации, и пространственно затрудненной оксигруппе получают с использованием ТМИС или иодистого аммония в качестве катализатора. Силилированные производные чувствительны к влаге, поэтому при их получении следует соблюдать меры предосторожности (использовать колбы с притертыми пробками, проводить реакции в инертной атмосфере, предварительно осушать растворитель на молекулярных ситах и т.д.) [4, 6, 8, 12, 14].

Ацилирование иногда бывает более предпочтительно, чем силилирование, вследствие большей стабильности таких производных, например, некоторых аминов. Для получения ацилированных производных, пригодных для селективного анализа методом ГХ-МС широко используются реагенты для ввода в молекулу фторсодержащих (трифторацетил, пентафторпропионил, гептафторбутирил и пентафторбензоил) и хлорсодержащих (трихлорацетил) ацильных групп. Для определения анаболических стероидов и стильбенов в физиологических жидкостях и мясе животных методом ГХ-МС в режимах ионизации электронным ударом и химической ионизации наиболее широко применяется дериватизация гептафтормасляным ангидридом (ГФМА) [4, 8, 12, 14].

Для масс-спектрометров с ограниченным диапазоном сканирования (например 650 а.е.м. для ионной ловушки «Saturn 2000R») масса молекулярных ионов дигептафтормасляных производных большинства стероидных гормонов находится за пределами этого диапазона, поэтому в этом случае лучше использовать пентафторпропионовый ангидрид [40].

При анализе полифункциональных соединений можно использовать модифицирующие реагенты, которые будут взаимодействовать с соседними или близлежащими группами, образуя циклические продукты. Соединения, в молекуле которых присутствуют несколько близко расположенных гидроксильных групп,

взаимодействуют в кислой среде с альдегидами или кетонами с образованием соответствующих ацеталей или кеталей. Две гидроксильные группы или одна гидроксильная группа и одна аминогруппа, расположенные у соседних углеродных атомов, могут взаимодействовать с алкилборными кислотами с образованием циклических боратов (рис. 3) [41].

Метод ГХ-МС позволяет количественно определять природные стероиды в физиологических жидкостях, органах и тканях животных. Однако, учитывая, что физиологические уровни стероидов могут сильно отличаться в зависимости от породы, пола, возраста, физиологического состояния животных, очень трудно дифференцировать происхождение природных стероидов в организме (экзогенное с целью стимуляции продуктивности или эндогенный синтез в организме). Для решения этой задачи в последние годы успешно применяется метод масс-спектрометрии изотопного отношения. Принцип метода основан на измерении отношения изотопов углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в молекулах стероидов. У синтетических стероидов, обычно получаемых из сапонины растительного происхождения, относительное содержание изотопа ^{13}C ниже, чем у эндогенных, общим предшественником которых при синтезе в организме является холестерол [39].

В последние годы для целей подтверждающего анализа успешно применяется тандемная масс-спектрометрия. Резкий рост селективности определения анализа в режиме тандемной масс-спектрометрии дает возможность упрощать процесс подготовки пробы, снижать требования к параметрам хроматографического разделения веществ. Наиболее интересные результаты получены на анализаторах типа «ионная ловушка». Достоинством ионной ловушки является возможность проводить не только МС/МС-эксперименты, но и многостадийные исследования. В этом случае после генерирования фрагментации материнского иона, один из дочерних ионов выбирается для дальнейшего изучения, а остальные выводятся из ловушки. С этим ионом проводятся те же операции по ускорению, иницированию столкновений и записи спектра теперь уже «внучатых» ионов изначального предшественника. Эта последовательность выделения ионов и их фрагментации может проводиться многократно. Такая техника называется (МС)ⁿ. Опубликованы результаты по записи масс-спектров фрагментов до десятого поколения исходного родительского иона [37].

Специфика контроля остаточного содержания большинства лекарственных средств для животных и токсинов биологического происхождения в продукции животноводства обусловлена тем, что они не могут быть переведены в летучие производные, подобно стероидным гормонам, β -агонистам, диоксинам или полихлорированным бифенилам. Поэтому большинство подтверждающих методов контроля антибиотиков, сульфаниламидов, кокцидиостатиков, антипротозойных препаратов, микотоксинов, алкалоидов, гликозидов, бактериальных токсинов и других ксенобиотиков в продуктах питания и кормах до недавнего времени было основано на высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием дополнительных процедур для повышения надежности идентификации анализа, таких, как пре- и постколоночная дериватизация, диодно-матричное детектирование, использование хроматографических колонок с разной полярно-

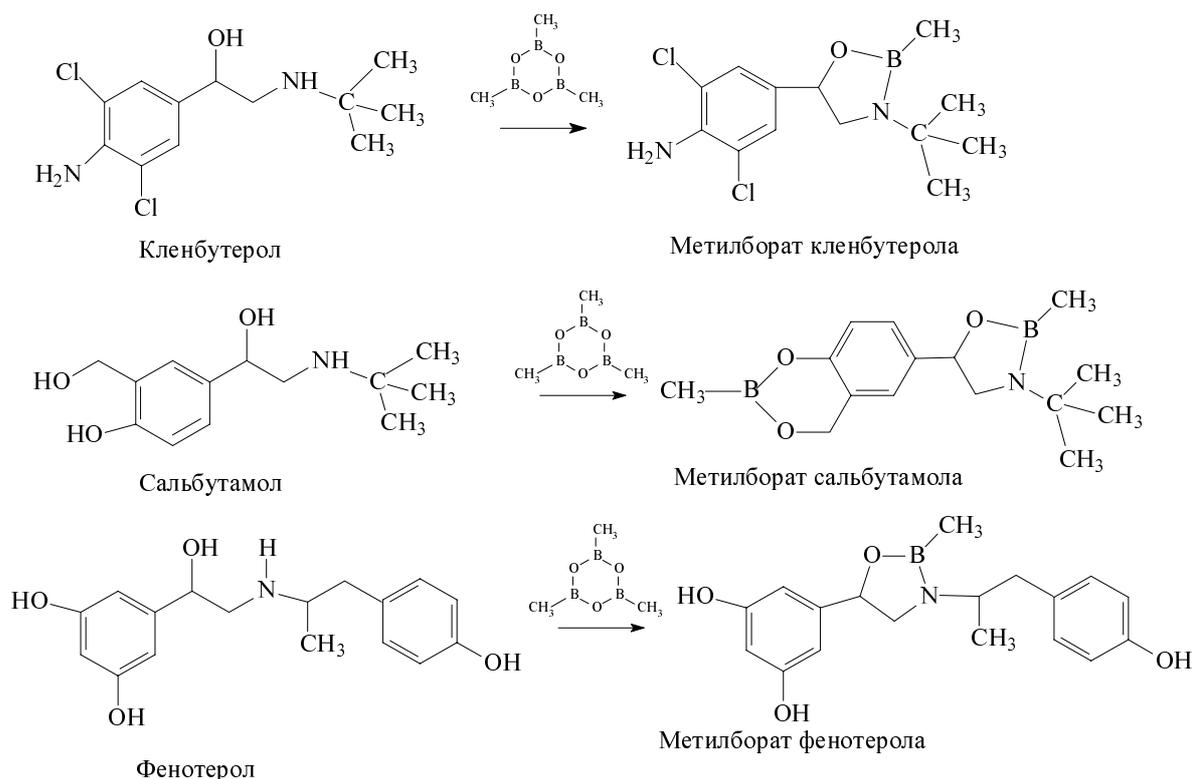


Рис. 3. Получение циклических метилборатных производных β -агонистов

стью и др. [42]. Настоящим прорывом в анализе термолabileльных, нелетучих и высокомолекулярных соединений, к которым можно отнести большинство лекарственных средств и биологических токсинов, стала разработка метода жидкостной хроматографии—масс-спектрометрии (ЖХ-МС), особенно с появлением новых высокоэффективных интерфейсов, таких, как термоспрей, электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении. Признанием важности этого открытия для современной науки стало присуждение в 2002 г. Нобелевской премии создателям методов электроспрея и матричной лазерной десорбционной ионизации (МЛДИ) Джону Фенну и Коичи Танаке.

Уже сегодня ЖХ-МС вытесняет все другие методы в качестве подтверждающей процедуры для определения остаточных количеств лекарственных средств в продукции животноводства. Использование этого метода позволило решить стратегическую задачу анализа остаточного количества ксенобиотиков — определение широкого диапазона веществ с помощью минимума методов за короткий промежуток времени. Специальная литература по использованию в последние годы ЖХ-МС при анализе остаточного содержания лекарственных средств в продуктах питания чрезвычайно обширна. В качестве иллюстрации этого позволим привести здесь лишь несколько примеров. Это многокомпонентные методы для одновременного определения: хлорамфеникола, тиамфеникола и флорфеникола в рыбе и морепродуктах, 12 сульфаниламидов в молоке и яйцах, 5 кокцидиостатиков в яйцах, 8 антигельминтиков в

молоке, 5 глюкокортикоидов в моче, метаболитов нитрофуранов в тканях и многие другие [43—48].

Общие критерии к ксенобиотикам в продуктах питания и кормах установлены в Решении Комиссии ЕС 2002/657/ЕС. Относительное время удерживания аналита на хроматографической колонке должно отличаться не более 0,5% от внутреннего стандарта для ГХ-МС и 2,5% — ЖХ-МС. Для идентификации аналита требуется не менее 4 идентификационных критериев для запрещенных веществ (группа А в соответствии с Директивой Совета ЕС 96/23/ЕС) и 3 идентификационных критерия для лекарственных средств и других ксенобиотиков (группа В в соответствии с Директивой Совета ЕС 96/23/ЕС) [11]. При использовании масс-спектрометрии низкого разрешения каждый ион-предшественник соответствует одному идентификационному критерию, а для тандемной масс-спектрометрии каждый дочерний ион оценивается в 1,5 идентификационных критерия. Учитывая вышеизложенное, для идентификации запрещенных веществ необходимо получить 4 родительских иона или один родительский и два дочерних иона [21]. Для выполнения этих жестких критериев идентификации зачастую приходится использовать два различных метода дериватизации, ионизации или использовать тандемную масс-спектрометрию. В Российской Федерации впервые эти критерии были учтены нами при разработке подтверждающих методов определения анаболических стероидов, стильбенов и β -агонистов методом ГХ-МС/МС [40, 41].

Среди ксенобиотиков техногенного происхождения особая роль отводится стойким органическим загрязнителям (СОЗ), регламентируемым Стокгольмской конвенцией ООН. Это несколько групп высокотоксичных хлорорганических веществ, обладающих канцерогенным, тератогенным, эмбриотоксическим, мутагенным действием. Они способны наносить вред человеку, сельскохозяйственным животным, птице и окружающей среде в очень низких концентрациях. К СОЗ относятся полихлорированные дибензо-*n*-диоксины (ПХДД) и дибензофураны (ПХДФ) (более 200 веществ), полихлорированные бифенилы (ПХБ) (более 200 соединений), хлорорганические пестициды (ХОП) (более 100 соединений).

Загрязнение окружающей среды диоксинами и ПХБ является причиной распространенности этих соединений в кормах и пищевых продуктах, что представляет серьезную опасность для здоровья потребителей. Более 90% диоксинов и ПХБ в организм человека поступает с пищей; 90% загрязненных пищевых продуктов — это продукты животного происхождения. Наиболее загрязнены диоксинами и ПХБ рыбий жир, рыбная мука, животные жиры. Высокая растворимость диоксинов и ПХБ в жирах и устойчивость во внешней среде способствуют их накоплению по мере продвижения по пищевой цепи. Благодаря способности к биоаккумуляции, уровни диоксинов и ПХБ в тканях рыб могут в тысячи раз превышать их концентрацию в окружающей среде [49].

Орто- и *орто*-монозамещенные ПХБ обладают более высокой токсичностью, сходной с токсичностью диоксинов, поэтому их называют «диоксиноподобными» ПХБ. В 1997 г. этим ПХБ экспертная группа ВОЗ присвоила коэффициенты относительной токсичности, по сравнению с токсичностью самого токсичного диоксина — 2,3,7,8-ПХДД, токсичность которого принята за 1. *орто*-Дизамещенные ПХБ менее токсичны [50].

В последние годы проведены обширные исследования по оценке загрязнения окружающей среды, кормов и продуктов питания диоксинами, однако при определении ПХБ учитывалось содержание только «маркерных» конгенов [49–51], которые являются доминирующими, а данных по содержанию «диоксиноподобных» ПХБ в продуктах питания и кормах недостаточно. В последние годы получены данные, показывающие, что в рыбьем жире и рыбной муке суммарная токсичность, обусловленная «диоксиноподобными» ПХБ, выраженная в факторах эквивалента токсичности (ТЭФ) в пересчете на 2,3,7,8-ПХДД по шкале Всемирной организации здравоохранения, в 5 раз превышает токсичность диоксинов. Для остальных кормовых материалов доля «диоксиноподобных» ПХБ в общей оценке токсичности может соответствовать токсичности диоксинов [51].

Учитывая высокую корреляцию между загрязнением кормов ПХБ и диоксинами, а также то, что технические смеси ПХБ, как правило, контаминированы диоксинами, наиболее рационально и эффективно первичный мониторинг загрязнения кормов диоксинами, дибензофуранами и ПХБ проводить по уровню ПХБ в кормах. Это значительно упростит процедуру, учитывая высокую стоимость и сложность определения диоксинов в кормах. Достаточно отметить, что во время известного «диоксинового» кризиса в Бельгии

1999 г. все загрязненные диоксинами образцы продукции содержали высокие концентрации ПХБ, имея среднее соотношение ПХБ : ПХДД/ПХДФ = 22000 : 1 [49].

В Российской Федерации системный мониторинг за содержанием ПХБ в продуктах питания и кормах до недавнего времени не проводился. Существующий «Метод изомерспецифического определения ПХБ в пищевых продуктах» в соответствии с МУК 4.1.1023-01, основанный на использовании ГХ с детектором электронного захвата (ДЭЗ), не распространяется на корма, а для подтверждающего анализа предпочтительнее использовать хромато-масс-спектрометрию (ГХ-МС). Кроме того, пробоподготовка в этом методе достаточно трудоемка (она включает гидролиз образца 5%-м раствором гидроксида натрия в 96%-м этаноле, экстракцию неомыляемой фракции гексаном с последующей очисткой ПХБ на колонке флорисилом и оксидом алюминия), что не позволяет осуществлять с помощью него эффективный мониторинг ПХБ в продуктах питания и кормах [52].

Жидкостная экстракция под давлением, которую также называют ускоренной экстракцией растворителями, — наиболее современный метод подготовки проб, разработанный корпорацией «Dionex» (США). Главные преимущества этого метода перед традиционной экстракцией в аппарате Сокслета — использование повышенных температур и давлений, что приводит к сокращению времени экстракции до 15 минут (от 6–8 часов при экстракции в сокслете), снижению в 10 раз количества растворителей, более высокой эффективности экстракции. Сочетание этих преимуществ с возможностью автоматизации процесса для одновременной экстракции 24 образцов, делает его незаменимым для проведения масштабных мониторинговых исследований. Еще одним принципиальным преимуществом этого метода является возможность одновременной очистки экстракта в процессе экстракции путем заполнения экстракционной ячейки различными сорбентами. Нами была разработана оригинальная схема упаковки экстракционной ячейки (слой сульфата натрия, образец, флорисил, 3 слоя силикагеля, обработанного серной кислотой, разделенные 2 слоями силикагеля, и слой оксида алюминия), позволяющая одновременно с экстракцией добиться достаточной очистки экстракта для определения ПХБ без дополнительной пробоподготовки [49].

Для скрининг-определения ПХБ оптимально использовать ГХ с ДЭЗ, а для подтверждающего — ГХ-МС/МС. Применение масс-спектрометра типа «ионная ловушка» и тандемной масс-спектрометрии обеспечивает высокую чувствительность и специфичность определения ПХБ, включая «диоксиноподобные».

Хлорорганические пестициды (ХОП), одни из наиболее опасных загрязнителей кормов и продуктов питания, отличаются высокой токсичностью, канцерогенными свойствами и стабильностью в окружающей среде, поэтому они включены в список ксенобиотиков для обязательного контроля.

Существующие в нашей стране официальные методики определения ХОП в фуражном зерне и комбикормах (ГОСТ 13496.20) морально устарели, так как основаны на традиционной жидкостной экстракции и химической очистке экстрактов серной кислотой, что приводит к разрушению пестицидов диенового синтеза [53]. Кроме того, использование на стадии количественного анализа

тонкослойной хроматографии или газожидкостной хроматографии на набивных колонках не позволяет достичь необходимой эффективности разделения для определения в одной пробе всех нормируемых ХОП.

В последние годы для определения ХОП в кормах и фуражном зерне применяется современный метод с использованием ТФЭ на отечественных твердофазных сорбентах, серийно выпускаемых ЗАО «БиоХимМак» (Россия), и капиллярной газожидкостной хроматографии. Главные преимущества этого метода заключаются в его более высокой чувствительности и селективности, что позволяет определять в течение одного анализа все нормируемые ХОП [54].

Самым распространенным методом определения тяжелых металлов является атомно-абсорбционный анализ благодаря высокой селективности, хорошей воспроизводимости и возможности выполнения массовых анализов. При определении тяжелых металлов в кормах и продуктах питания у нас в стране основное внимание до недавнего времени уделялось пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС). В последние годы предпочтение отдается электротермической ААС, обладающей более высокой чувствительностью для большинства элементов, в сочетании с пробоподготовкой в закрытых микроволновых системах. Преимущества закрытых систем для проборазложения очевидны: это исключение потери определяемых элементов в виде легколетучих соединений, экологичность, высокая производительность (быстрота), сокращение расхода реактивов и предотвращение контаминации пробы из внешней среды или от других проб. Разложение органической матрицы в тефлоновых закрытых сосудах в микроволновых печах — наиболее современный метод подготовки проб для ААС [55].

В последние годы у нас в стране разработан ряд методик для определения тяжелых металлов в пищевых продуктах и кормах электротермической ААС в графитовом атомизаторе с использованием закрытых систем для разложения проб. Снижение влияния компонентов матрицы и увеличение воспроизводимости методов достигалось в ряде случаев с помощью использования модификаторов, например, смеси нитрата палладия с нитратом магния [56, 57].

Наиболее опасные ксенобиотики биологического происхождения — микотоксины. В настоящее время известно более 20 видов различных плесневых грибов, которые продуцируют около 100 токсинов, являющихся причиной серьезных заболеваний человека и животных. Среди них выделяются своими токсическими, канцерогенными свойствами афлатоксины. Частая встречаемость в продуктах питания и кормах, высокая токсичность, возможность перехода в продукцию животноводства (молоко) и птицеводства (яйца) определяют острую необходимость организации регулярного контроля за содержанием этих микотоксинов в кормах и продуктах питания [58].

Современная методология определения микотоксинов в кормовой и пищевой продукции включает использование скрининговых и подтверждающих методов анализа. Скрининговые методы используют для быстрого выявления загрязненной микотоксинами продукции, чтобы в дальнейшем подтвердить такую продукцию тщательному подтверждающему анализу.

На предприятиях (элеваторах, комбикормовых заводах) в США на первом этапе широкое распростра-

нение получили установки, в которых сырье (зерно, орехи и др.) пропускают под источником длинноволнового УФ-света. Наличие ярко-зеленой флуоресценции под действием такого излучения хорошо коррелирует с присутствием афлатоксинов в сырье. В дальнейшем такую продукцию подвергают более тщательному инструментальному анализу. Например, используют специальные колонки с сорбентом, через которые пропускают экстракт контролируемой продукции. Микотоксин из экстракта сорбируется на колонке и хорошо виден при облучении колонки УФ-светом. Этим методом можно проводить предварительный полуколичественный анализ микотоксинов, сравнивая степень свечения со специальной стандартной шкалой. Для определения микотоксинов, которые не имеют собственной флуоресценции, в колонку вводят специальный модификатор, делающий видимым микотоксин в УФ-свете (например, хлористый алюминий для определения ДОНа (микотоксин дезоксиниваленол)). В качестве скринингового метода определения микотоксинов в последние годы все более широкое распространение получает иммуоферментный анализ [59].

Для подтверждающего определения микотоксинов наиболее эффективно использовать ВЭЖХ и ГХ с разными системами детектирования (УФ, флуоресцентные, ДЭЗ и масс-спектрометрические детекторы). Так в «Методических указаниях по количественному определению афлатоксина В₁ в кормах», скрининговое определение предлагается проводить методом ТСХ по флуоресценции афлатоксина В₁ в УФ-свете или ВЭЖХ в УФ-области при 360 нм. Для подтверждающего анализа используется ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием циклического гемиацетала афлатоксина В_{2а}, получаемого путем дериватизации В₁ трифторуксусной кислотой. Благодаря тому что флуоресценция афлатоксина В_{2а} интенсивнее, чем у В₁, чувствительность определения этим методом существенно выше, чем без предварительной модификации молекулы [60].

Заключение

С расширением ассортимента применяемых в ветеринарии лекарственных средств увеличиваются требования к скрининговым и подтверждающим методам определения их остаточных количеств в животноводческой продукции. При этом аналитические технологии должны развиваться как в направлении создания автоматизированных скрининговых систем, основанных на биосенсорах, методах рецепторного анализа, позволяющих в режиме реального времени анализировать безопасность продовольствия, так и создания все более надежных подтверждающих мультиметодов, использующих последние достижения масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса для получения надежной информации о структуре аналита. Особые усилия должны быть направлены на разработку новых эффективных технологий, таких как молекулярный импринтинг, твердофазное диспергирование и др., позволяющих проводить быстрое выделение и одноэтапную селективную очистку анализируемых веществ из нативных экстрактов. Должный уровень безопасности продовольствия может быть гарантирован только при использовании современных эффективных методов анализа и обеспечении высокого качества аналитических работ в лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. McEvoy J.D.G. *Analytica Chimica Acta*, 2002, v. 473, p. 3–26.
2. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996. Official Journal of the European Communities, 23/05/1996, L125. P. 10–32.
3. Панин А. Н., Комаров А.А. Продовольственная безопасность России. М.: Издательский Дом НП, 2005, с. 127–134.
4. Комаров А.А. С.-х. биология, 2003, № 4, с. 3–20.
5. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. V. 27. Sex Hormones. Int. Agency for Research on Cancer, Lyon, 1995.
6. Комаров А.А. С.-х. биология, 2002, № 4, с. 12–20.
7. Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G. e. a. *Anal. chim. acta*, 2002, v. 473, p. 71–82.
8. O'Keefe M. Residue Analysis In Food Principles And Applications. Harwood Academic Publishers, 2000, 308 p.
9. Whitaker T.B., Dowell F.E., Hagler W.M. e. a. *J. AOAC Int.*, 1994, v. 77, p. 107–116.
10. Hassett T., Patey A.L., Shearer G. In: Proc. EuroResidue. Rijksuniversiteit Utrecht, Faculteit der Diergeneeskunde, Utrecht, The Netherlands, 1990, p. 211–215.
11. Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G. e. a. *Anal. chim. acta*, 2002, v. 473, p. 71–82.
12. Комаров А.А. Контроль за содержанием ветеринарных препаратов в кормах и продукции животноводства. Международная промышленная академия. М.: Пищепромиздат, 2003, 76 с.
13. O'Keefe M. Methods for Veterinary Drug Residue Analysis in Food The National Food Centre. Research Report № 9. Dublin, 1999, 30 p.
14. Gower D.B., Houghton E., Kicman A.T. In: Steroid Analysis. Eds. H.L.J. Makin, D.B. Gower, D.N. Kirk. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995, p. 468–526.
15. Lau J.H.W., Khoo C.S., Murby J.E. *J. AOAC Int.*, 2004, v. 87, p. 31–38.
16. Van Ginkel L.A. *J. Chromatogr.*, 1991, v. 564, p. 363–403.
17. Huopalahti R.P., Henion J.D. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 1996, v. 19, p. 69–87.
18. Hooijerink H., van Bennekom E.O., Nielen M.W.F. *Anal. chim. acta*, 2003, v. 483, p. 51–59.
19. Codex Alimentarius. V. 3. Resdues of Veterinary Drugs in Foods, 2nd ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1993.
20. Horwitz W. *Pure Appl. Chem.*, 1995, v. 67, p. 331–343.
21. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). Official Journal of the European Communities. 17.8.2002. P. L221/8-L221/36.
22. Method of detecting residues of antibacterial substances in fresh meat. Four plate test. Document UCM 90/01/Review 1. CNEVA, Laboratoire des Medicaments Veterinaires, Fougères, France, 1993, 11 p.
23. Fabre J.M., Mircovich C., Geijp E. Antibiotic residues in pork and poultry meat in France: the current situation and an evaluation of a new screening test. *Bull. GTV*, January/February, 2004, 15 p.
24. Shearan P., O'Keefe M. *Analyst.*, 1994, v. 119, p. 2761–2764.
25. Brooks R.V., Firth R.G., Sumner R.A. *Brit. J. Sports Medicine*, 1975, v. 9, p. 89–92.
26. Hahnau S., Julicher B. *Food Additives and Contaminants*, 1996, v. 13, p. 59–74.
27. Stanker L.H., Beier R.C. In: Immunoassays for Residue Analysis-Food Safety. Eds. R.C. Beier, L.H. Stanker. ACS Symp. Ser. 621, 1996, p. 16–27.
28. Scippo M-L., Van De Weerd C., Willemsen P. e. a. *Anal. chim. acta*, 2002, v. 473, p. 135–141.
29. Traynor I.M., Crooks S.R.H., Bowers J., Elliott C.T. *Ibid.*, 2003, v. 483, p. 187–191.
30. Komarov A., Vylegzanina Y., Panin A. *J. Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2003, v. 26 (Supp. 1), p. 298–299.
31. Komarov A., Vylegzanina Y., Panin A. *Ibid.*, 2003, v. 26 (Supp. 1), p. 299.
32. Комаров А.А., Выегжанина Е.С. Сб. науч. тр. ВГНКИ. М.: Компания Спутник+, 2003, т. 64, с. 287–295.
33. Комаров А.А., Панин А.Н. Патент РФ № 2218351. Бюл. № 34 от 10.12.2003.
34. Комаров А.А., Панин А.Н., Буркин А.А. Патент РФ № 2218352. Бюл. № 34 от 10.12.2003.
35. Комаров А.А., Выегжанина Е.С., Панин А.Н. Патент РФ № 2243235. Бюл. № 36 от 27.12.2004.
36. Jourdan S.W., Scutellaro A.M., Hayes M.C., Herzog D.P. In: Immunoassays for Residue Analysis-Food Safety. Eds. R.C. Beier, L.H. Stanker. ACS Symp. ser. 621, 1996, p. 17–28.
37. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003, 493 с.
38. Antignac J.-P., Monteau F., Negriolli J. e. a. *Chromatographia*, 2004, v. 59, p. S-13–S-22.
39. Le Bizec B., Marchand P., Maume D. e. a. *Ibid.*, 2004, v. 59, p. S-3–S-12.
40. Комаров А.А., Крапивкин Б.А., Благодатских С.В., Панин А.Н. Докл. РАСХН, 2003, № 4, с. 41–44.
41. Комаров А.А., Крапивкин Б.А., Панин А.Н. Там же, 2004, № 6, с. 45–48.
42. Комаров А.А., Панин А.Н. *Ветеринария*, 2002, № 11, с. 40–43.
43. Van de Riet J.M., Potter R.A., Christie-Fougere M., Burns G. J. *AOAC Int.*, 2003, v. 86, p. 510–514.
44. Bogialli S., Curini R., Di Corcia A. e. a. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, v. 51, p. 4225–4232.
45. Mortier L., Daeseleire E., Delahaut P. *Anal. chim. acta*, 2003, v. 483, p. 27–37.
46. De Ruyck H., Daeseleire E., De Ridder H., van Renterghem R. *J. Chromatogr.*, 2002, v. 976, p. 181–194.
47. O'Keefe M.J., Martin S., Regan L. *Anal. chim. acta*, 2003, v. 488, p. 341–350.
48. Conneely A., Nugent A., O'Keefe M. e. a. *Ibid.*, 2003, v. 483, p. 91.
49. Комаров А.А. Техногенные токсиканты в кормах. Международная промышленная академия. М.: Пищепромиздат, 2003, 62 с.
50. Van Den Berg M. *Environ. Health Perspect.*, 1998, v. 106, p. 775–792.
51. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Dioxin Contamination of Feedingstuffs and Their Contribution to the Contamination of Food of Animal Origin. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Adopted on 06 November 2000, 105 p.
52. Изомерспецифическое определение полихлорированных бифенилов в пищевых продуктах. Методические указания МУК4.1.1023-01, 20 с.
53. Государственный стандарт «Комбикорма. Комбикормовое сырье. Метод определения остаточных количеств пестицидов». ГОСТ 13496.20-87. М.: Изд-во стандартов, 1987.
54. Комаров А.А., Благодатских С.В. Сб. научн. тр. ВГНКИ, М., 2001, т. 63, с. 222–230.
55. Ермаченко Л.А., Ермаченко В.М. Атомно-абсорбционный анализ с графитовой печью. М.: ПАИМС, 1999, 220 с.
56. Комаров А.А., Иванова Е.В. *Ветеринария*, 2000, № 2, с. 49–52.
57. Панин А.Н., Комаров А.А., Иванова Е.В. Мат. 5-ой междунаучно-практ. конф. «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции». М., 2004, с. 107–108.
58. Комаров А.А., Панин А.Н. Микотоксикозы животных. М.: Пищепромиздат, 2003, 82 с.
59. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Соболева Н.А. *Прикл. биохимия и микробиол.*, 2002, т. 38, № 5, с. 571–577.
60. Методические указания по количественному определению афлатоксина В₁ в кормах. Утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 7.10.1998 г.