

Методы оценки остаточного количества антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочной продукции



О. С. Чаплыгина*^{ORCID}, А. Ю. Просеков^{ORCID}, А. Д. Веснина^{ORCID}

Кемеровский государственный университет^{ORCID}, Кемерово, Россия

Поступила в редакцию: 09.12.2021

Поступила после рецензирования: 30.01.2022

Принята к публикации: 14.02.2022

*e-mail: chaplygina_95@mail.ru

© О. С. Чаплыгина, А. Ю. Просеков,
А. Д. Веснина, 2022



Аннотация.

Контроль за содержанием антибиотиков группы амфениколы в животноводческой продукции – важная задача пищевой промышленности. Их попадание и накопление в организме человека приводит к появлению устойчивости к действию antimicrobials препаратов, используемых в лечении инфекционных заболеваний. Цель работы – обобщение и анализ научных публикаций, посвященных методам идентификации остаточных следов антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочной продукции.

В ходе работы проанализированы научные статьи российских и зарубежных ученых за последние 6 лет, размещенные в базах данных PubMed от National Center for Biotechnology Information (США), Scopus и ScienceDirect от Elsevier, на платформе Web of Science и в отечественной электронной библиотеке eLibrary.Ru.

Анализ научной литературы показал, что амфениколы широко используются в сельском хозяйстве. Опасные остаточные антибиотические вещества попадают в организм человека с пищей животного происхождения (молоко). Представлена информация об основных методах определения данных антибиотиков – скрининг и количественное определение. Показано, что эффективным методом оценки являются хроматографические, а именно высокоэффективная жидкостная хроматография с различными модификациями. Данные методы не лишены проблем с пробоподготовкой сырья – молока и сложной матрицы, приводящей к закупориванию капилляра. Следовательно, перспективны исследования в области очистки данного сырья и дальнейшего выделения амфениколов.

Рассмотрены основные методы идентификации антибиотиков группы амфениколы в молоке и продуктах его переработки. Обоснована перспектива разработки новых аналитических методов выделения и анализа остаточного количества антибиотиков данной группы.

Ключевые слова. Антибиотики, амфениколы, молоко, хроматография, биосенсоры, аптасенсоры, животноводческая продукция, антибиотикорезистентность

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ при государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2694.2020.4).

Для цитирования: Чаплыгина О. С., Просеков А. Ю., Веснина А. Д. Методы оценки остаточного количества антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочной продукции // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52. № 1. С. 79–88. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-1-79-88>

Determining the Residual Amount of Amphenicol Antibiotics in Milk and Dairy Products

Olga S. Chaplygina*^{ID}, Alexander Yu. Prosekov^{ID}, Anna D. Vesnina^{ID}

Kemerovo State University^{ROR}, Kemerovo, Russia

Received: 09.12.2021

Revised: 30.01.2022

Accepted: 14.02.2022

*e-mail: chaplignina_95@mail.ru

© O.S. Chaplygina, A.Yu. Prosekov, A.D. Vesnina, 2022



Abstract.

Controlling the level of amphenicol antibiotics in animal products is an important task for the contemporary food industry. Amphenicols are widely used in agriculture. Residual antibiotic substances enter the human body with food of animal origin, e.g. milk, and may lead to resistance to antimicrobial drugs. The research objective was to analyze scientific publications on various methods for identifying residual amphenicol antibiotics in milk and dairy products.

The review covered six years of Russian and foreign publications from the PubMed databases of the National Center for Biotechnology Information (USA), Scopus and ScienceDirect databases of the Elsevier, the Web of Science platform, and the domestic electronic library eLibrary.Ru.

Screening and quantification proved to be the main methods for their determination. Chromatographic methods, i.e. various types of high performance liquid chromatography, appeared to be especially effective. These methods often experience problems with sample preparation because milk tends to clog the capillary. Thus, food science needs further studies in the field of milk purification and isolation of amphenicols.

The article describes the main methods for identifying amphenicol antibiotics in milk and dairy products and defines the prospect of further research.

Keywords. Antibiotics, amphenicols, milk, chromatography, biosensors, aptasensors, animal products, antibiotic resistance

Funding. The research was supported by the grant of the President of the Russian Federation for the state support of leading scientific schools (Scientific School No. 2694.2020.4).

For citation: Chaplygina OS, Prosekov AY, Vesnina AD. Determining the Residual Amount of Amphenicol Antibiotics in Milk and Dairy Products. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(1):79–88. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-1-79-88>

Введение

Открытие пенициллина Александром Флемингом в 1928 г. ознаменовало наступление новой эры в борьбе с микроорганизмами. Изначально антибиотики назначались людям в качестве средства борьбы со смертельными заболеваниями [1]. В 1940-х гг., в период роста спроса населения на мясо и птицу, осуществлялись исследования в области питания животных и формирования кормов и кормовых добавок для увеличения производства мяса [2, 3]. E. L. Stokstad, изучающий влияние побочных продуктов ферментации *Streptomyces aureofaciens* – недорогого источника витамина B₁₂, добавляемого в корма животных, обнаружил, что «неопределенный» ингредиент в ферментированном «пюрированном» виде увеличивал скорость роста цыплят [4]. Дальнейшие исследования установили, что данным «неопределенным» компонентом являлся антибиотик, продуцируемый *S. aureofaciens*. Дополнительные

исследования показали, что добавление небольшого количества антибиотиков в корма животных является фактором, стимулирующим рост и предотвращающим развитие различных заболеваний молочных коров, кур и свиней [5]. Данные открытия привели к массовому использованию антибиотиков в качестве стимуляторов роста в области животноводства. В результате, помимо лечебных и профилактических целей, антибиотики стали активно использоваться в качестве кормовых добавок для увеличения массы тела, а также в качестве консервантов для кормов [6, 7].

Антибиотики – это лекарства, используемые для лечения бактериальных инфекций. Их широкое использование в рационе сельскохозяйственных животных является одной из серьезных проблем обеспечения безопасности пищевых продуктов [8, 9]. Важным является тот факт, что производители животноводческой продукции являются инициаторами

добавления большого количества антибиотиков в свою продукцию. Опасность использования антибиотиков в сельском хозяйстве связана с тем, что данные вещества, попадая в организм животных, способны длительное время циркулировать в нем, а их остатки попадать в продукты животного происхождения (молоко, мясо, яйца и др.) [6, 10, 11]. Антибиотики попадают в организм человека с пищевыми продуктами, приводя к появлению устойчивости патогенных и условно-патогенных штаммов, находящихся в организме человека, лечению антибиотиками. Это формирует одну из важных угроз здоровой жизнедеятельности населения [12, 13].

Амфениколы – антибиотики, обладающие широким спектром действия по отношению ко многим видам грамположительных и грамотрицательных бактерий, т. е. предотвращающие развитие ряда инфекционных заболеваний (брюшного тифа, сальмонеллеза, бруцеллеза, менингококковой инфекции, хламидиоза и др.). Широкий спектр противомикробной активности, а также относительно невысокая стоимость делает антибиотики данной группы широко востребованными в ветеринарной практике [14, 15]. При добавлении амфениколов в корм происходит снижение падежа молодняка, ускорение процессов роста и развития, а также сокращение объема потребления кормов на 5–10 % [16].

Молоко является важным источником питательных веществ и популярной натуральной здоровой пищей как для людей, так и для животных [17]. Востребованность молока и молочных продуктов обусловлена большим содержанием высокобиодоступных основных питательных веществ, которые важны в рационе человека [18]. Производство молочной продукции быстро расширяется в развивающихся странах в связи с ростом населения. По результатам анализа статистических данных количество потребленного молока за 2020 г. составило примерно 903 млн т в мире [19, 20]. Так как амфениколы являются часто используемыми антибиотиками для лечения мастита у молочного скота, то высок риск его попадания в продукты животноводства [21].

Попадание остаточных количеств антибиотиков данной группы в организм человека через употребление молока и молочной продукции имеет ряд серьезных последствий для здоровья. Это дисбактериоз кишечника, нарушение обмена веществ, возникновение аллергических реакций, в том числе анафилактический шок, а также мутагенный, токсический, тератогенный и канцерогенный эффекты на организм потребителя и др. [22, 23]. Также попадание группы амфениколы с молоком и молочными продуктами в организм человека стимулирует рост устойчивости микроорганизмов к ним.

Антибиотикорезистентность стала одной из основных международных проблем современного здравоохранения. Ежегодно в Европейских странах умирает более 25 000 человек из-за инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями [10]. Появление возбудителей инфекционных заболеваний, устойчивых к действию антибиотиков, ухудшает течение болезни и увеличивает затраты на лечение. Такие заболевания трудно или даже невозможно вылечить [23–25]. В дополнение к устойчивости к антибиотикам необходимо также учитывать технологическое воздействие в процессе производства молока и молочных продуктов, поскольку амфениколы, как и другие противомикробные препараты, могут ингибировать заквасочные культуры, вызывая нарушения в процессе созревания сыров [26, 27]. Поэтому необходим строгий контроль содержания антибиотиков в пищевых продуктах животного происхождения.

Разработано множество технологий для анализа остатков амфениколов в молоке и молочной продукции: от быстрого скрининга до подтверждающих методов. Методы быстрого скрининга включают иммунологические методы и методы, основанные на использовании биосенсоров. Подтверждающие методы анализа – газовая и жидкостная хроматография, методы капиллярного электрофореза. Часто для определения антибиотиков используются хроматографические методы анализа [28]. Преимуществом данных методов является их высокая чувствительность и специфичность. Однако они характеризуются большой длительностью анализа. Также в процессе пробоподготовки анализируемого компонента есть возможность потерь определяемого вещества, которая приводит к недостаточно точным результатам. Поэтому важна разработка нового подхода к определению антибиотиков методом жидкостной хроматографии для их простого и быстрого скрининга в продуктах животного происхождения.

Цель работы – проведение анализа научной литературы, описывающей современные достижения в области идентификации остаточных следов антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочной продукции.

Для достижения поставленной цели реализованы следующие задачи: проанализированы основные достоинства и недостатки современных методов определения остаточного количества амфениколов в молоке и молочной продукции; систематизированы полученные данные для дальнейшего совершенствования и разработки новых методов выделения и идентификации загрязняющих веществ из молока.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования является общедоступная научная литература, посвященная способам концентрирования, выделения и идентификации

остаточного количества антибиотиков в молоке и молочной продукции, а также анализу скрининговых и инструментальных методов анализа антибиотиков группы амфениколы. Поиск научной литературы осуществлялся в следующих информационных базах данных: PubMed от National Center for Biotechnology Information (США), Scopus и ScienceDirect от Elsevier, на платформе Web of Science и в отечественной электронной библиотеке eLibrary.Ru. Обзор включал анализ исследовательских, концептуальных и обзорных публикаций, соответствующих тематике запроса, исключая главы из книг, материалы конференций, сборники трудов и т. д. Также анализировались общедоступные отчеты аналитических компаний Shimadzu и Agilent Technology. Глубина поиска составила 6 лет, язык поиска – английский и русский.

В рамках данной работы проведен аналитический обзор 56 зарубежных и отечественных научных литературных источников.

Результаты и их обсуждение

Антибиотики группы амфениколы (рис. 1), к которой относятся тиамфеникол, флорфеникол, флорфеникол амин и наиболее распространенный хлорамфеникол, широко используются в ветеринарии для лечения инфекций у животных из-за их широкого спектра действия против большинства патогенов, а также доступности и невысокой стоимости [29, 30]. Амфениколы эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.), особенно против анаэробных организмов (*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Yersinia* spp., *Proteus* spp., *Rickettsia* spp.). При

чрезмерном и неконтролируемом употреблении антибиотиков в организме человека возникают следующие серьезные побочные эффекты: заболевания сердечно-сосудистой системы, костного мозга, возникновение эмбриотоксичности и способности к возникновению лейкемии, апластической анемии и синдрома серого ребенка (синдром Грея). Поэтому во многих странах, включая США, Канаду и Китай, запрещено использование амфениколов у животных, которые участвуют в производстве пищевых продуктов [31–33].

Примерно в 64 % от всех проанализированных работ, описанных в научной литературе с 2017 по 2021 гг., хлорамфеникол (представитель группы амфениколов) используется в качестве основного антибиотика в области сельского хозяйства. В ходе анализа литературных данных установлено, что наиболее часто анализируемой пищевой матрицей для определения антибиотиков является молоко и продукты его переработки. За ними следуют мясо и мясные продукты, рыба, морепродукты и мед [34].

Методы, используемые для определения антибактериальных препаратов в молоке, подразделяются на две основные группы. Первая состоит из методов скрининга, а вторая из подтверждающих методов.

В качестве перспективных скрининг-методов определения амфениколов в молоке и молочной продукции используют различные биосенсоры. Они позволяют обнаруживать конкретные соединения в сложных структурах (в частности в молоке). Биосенсоры представляют собой устройство, в котором используются определенные биологические элементы (такие как ферменты, антитела и аптамеры) и/или биохимические реакции для обнаружения конкретных химических аналитов посредством

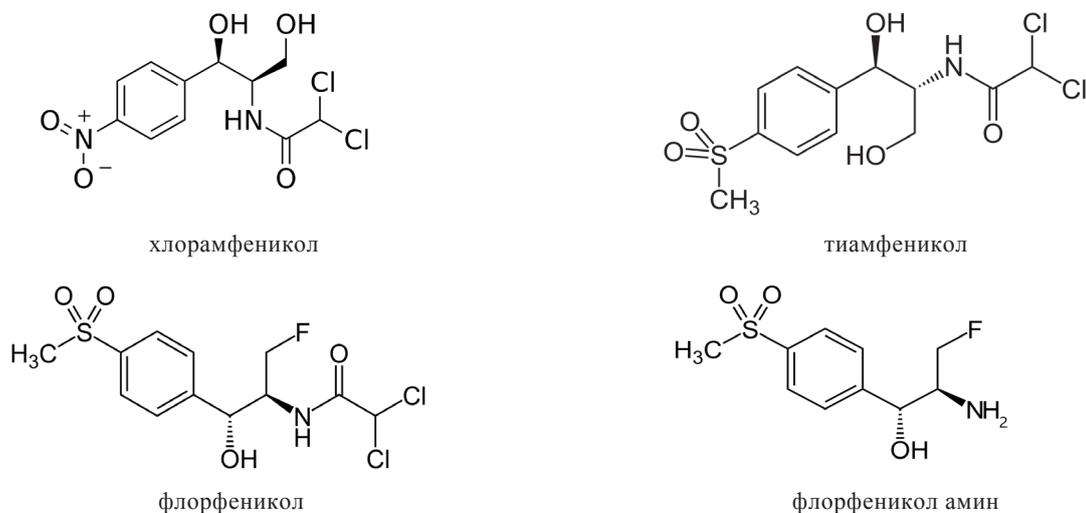


Рисунок 1. Структурное строение антибиотиков группы амфениколы

Figure 1. Structural structure of amphenicol antibiotics

количественной оценки оптических, тепловых, электрических или пьезоэлектрических сигналов [34–36].

Одним из современных типов биосенсоров являются биосенсоры на основе аптамеров (аптасенсоры), которые представляют собой эффективные сенсорные платформы для мониторинга амфениколов в продуктах животного происхождения (в т. ч. в молоке и молочной продукции). Существующие аптасенсоры амфениколов можно разделить на две основные категории: оптические и электрохимические [37, 38].

Оптические аптасенсоры продемонстрировали прогресс из-за своих важных характеристик, включая высокую чувствительность, селективность и быстрое реагирование без необходимости в сложных аналитических инструментах [39, 40]. Колориметрический, флуоресцентный, хемилюминесцентный и иммуноферментный анализ – это технические методы, применяемые для изготовления оптических аптасенсоров. Колориметрические аптасенсоры, обладающие потенциалом для анализа невооруженным глазом, считаются простейшим подходом к зондированию, который использует свойство агрегации, индуцированной солью и наночастицами золота. Изготовленные колориметрические аптасенсоры подходят для обнаружения «на месте», поскольку не требуются интеркалирующие красители и флуоресцентные метки [41, 42]. Среди оптических методов метод флуоресценции эффективен для создания аптасенсоров с максимальной способностью обнаружения амфениколов, вплоть до уровня пикомолей, с использованием квантовых точек и наночастиц [43].

Недавний прогресс в области электрохимических аптасенсоров продемонстрировал их способность количественно определять хлорамфеникол с высокой чувствительностью. Среди электрохимических аптасенсоров – вольтамперометрические и электрохемилюминесцентные датчики, которые могут определять значения хлорамфеникола на уровне фемтомоль. Таким образом, вольтамперометрия и методы электрохемилюминесценции проявляют большой потенциал для создания сверхчувствительных аптасенсоров для обнаружения хлорамфеникола. Аптасенсоры на электрохимической основе обладают более низким пределом обнаружения и более высокой способностью обнаруживать хлорамфеникол по сравнению с оптическими [44, 45].

Известны другие исследования в области аптасенсоров. Y. Duan и др. предложили методу идентификации хлорамфеникола в молоке с помощью специфичного аптамера и флуоресцентной количественной ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) [34]. Суть метода заключается в гибридизации хлорамфеникол-

специфического аптамера с модифицированным биотином комплементарным зондом и дальнейшей его иммобилизацией на конъюгированных со стрептавидином магнитных шариках. При наличии хлорамфениколов в исследуемом образце полученный аптамер связывается с ними, образуя структуру шпильки, а затем высвобождается из магнитных шариков и детектируется с помощью qRT-PCR. Для определения оптимальных условий обнаружения хлорамфениколов анализировали влияние таких факторов, как длина цепи зонда, концентрация аптамера, концентрация NaCl и время инкубации. При оптимальных условиях разработанная методика отличалась высокой чувствительностью и позволяла определить хлорамфениколы от 0,1 до 20,0 нг/мл. Данная методика проявила высокую селективность в отношении структурных аналогов хлорамфеникола, таких как тиамфениколы и флорфениколы [34].

Ученые из Ирана представили флуоресцентный метод определения следов хлорамфеникола в молоке и меде с помощью оптического датчика на основе наноструктурированного полимера с молекулярным отпечатком, нанесенного на люминесцентный циркониевый металлоорганический каркас. Данный метод позволил определить концентрацию хлорамфеникола в диапазоне от 0,16 до 161,56 мкг/л с пределом обнаружения 0,013 мкг/л [46].

Несмотря на уникальные преимущества аптасенсоров на оптической и электрохимической основе, недостатком данного скрининг-метода является их длительное изготовление и доступность.

Вторая группа методов определения амфениколов включает подтверждающие методы, т. е. методы, основанные на количественном определении. Для количественного определения амфениколов в молоке, как и в других продуктах животного происхождения, необходимо проведение двух основных этапов: подготовка образцов с последующим разделением и обнаружение антибиотиков в подготовленных пробах. Подготовка проб – важный этап всего аналитического процесса, т. к. во время пробоподготовки важно правильно извлечь и сконцентрировать анализируемые вещества, а также удалить как можно больше загрязняющих соединений [47, 48]. Поэтому современные исследования связаны не только с постановкой метода на приборе и оптимизацией детекторов, но и с разработкой новых способов очистки и выделения целевого компонента на этапе пробоподготовки.

В литературе, опубликованной с 2017 по 2021 гг., в качестве востребованного и эффективного количественного метода оценки антибиотиков в продукции использовалась высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Ее востребованность для анализа амфениколов при исследовании молока и молочных продуктов объясняется возможностью одновременного

анализа нескольких остатков в образце за короткое время. ВЭЖХ получает широкое применение в лабораториях по контролю за качеством в пищевом производстве [49, 50]. Для определения остаточного количества хлорамфеникола в образцах молока в работе L. R. Guidi и др. представлена методология твердофазной магнитной экстракции (MSPE) в сочетании с методикой ВЭЖХ с диодной матрицей (HPLC-DAD) [51]. В качестве твердофазного сорбента были синтезированы и подробно охарактеризованы магнитные наночастицы, покрытые нановолокном, с использованием полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FE-SEM), рамановской спектроскопии и анализа порошковой рентгеновской дифракции (XRD). Экспериментальные параметры метода MSPE для обоих анализов антибиотиков были систематически исследованы и оптимизированы. После MSPE для обоих анализов ($R^2 > 0,9954$) был получен линейный диапазон – 10,0–600,0 нг/мл. Предел обнаружения (LODS) для хлорамфеникола составил 3,02 нг/мл. Разработанный метод, основанный на MPSE-HPLC-DAD, был применен к образцам молока для количественного определения остатков антибиотиков. Значения восстановления были найдены в диапазоне 94,6–105,4 % ($n = 3$) при использовании модельного раствора с добавками.

Y. Xie и др. разработали быстрый, простой и эффективный метод одновременного определения трех общих остатков антибиотиков, включая хлорамфеникол в сыром молоке [52]. Метод молекулярного импринтинга в сочетании с твердофазной экстракцией был использован для предварительной обработки тестовых образцов, а затем одновременно обнаружен с помощью ВЭЖХ. Весь процесс, включая только одну стадию предварительной обработки, позволил обнаружить всю целевую молекулу с использованием специального метода обогащения и анализа. Восстановление хлорамфеникола составило 72,94–83,57 %. Метод подходил для рутинного анализа, а экспериментальная процедура была упрощена. Время обнаружения значительно сократилось. Этот метод показал широкую перспективу применения для обнаружения остатков антибиотиков в сыром молоке [52].

В работе E. Patury и K. Kwiatek разработан чувствительный и надежный метод с использованием жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией отрицательной ионизацией электрораспылением для одновременного определения следовых количеств хлорамфеникола, флорфеникола и тиамфеникола [53]. Аналиты извлекали этилацетатом. Далее этилацетат испаряли, остаток повторно суспендировали в воде высокой степени очистки, обезжиривали n-гексаном, а твердофазную экстракцию проводили с помощью картриджей

BondELUT C18. Сепарацию проводили на фенильной колонке C6 с подвижной фазой, состоящей из 0,1 % муравьиной кислоты в воде высокой степени очистки и ацетонитрила. Отклик детектора был линейным в диапазоне испытанных концентраций от 100 до 1000 мкг/кг. Значения извлечения для всех аналитов были выше 79 % с RSD для повторяемости и воспроизводимости в диапазонах 4,5–10,9 и 8,4–13,5 % соответственно. Результаты показали, что этот метод эффективен для количественной оценки амфениколов в молоке и молочной продукции.

В работе В. Г. Амелина и др. рассматривался простой способ подготовки образцов и определения антибиотиков амфениколов в пищевых матрицах животного происхождения методом хроматографии – квадруполь-время пролетной масс-спектрометрии [54]. Процесс подготовки проб заключался в экстракции антибиотиков ацетонитрилом и двойным разбавлением полученных экстрактов деионизированной водой. Амфениколы предлагается определять методом добавок путем суммирования площадей сигналов всех зарегистрированных аддуктов.

Простой, дешевый и быстрый метод определения хлорамфеникола представлен в работе T. Śniegocki и др. с использованием метода QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) [47]. Для качественного подтверждения и количественной оценки остатков хлорамфеникола использовалась система ВЭЖХ-МС/МС. Лучшее разделение (симметричная форма пика и минимальный матричный эффект) и длительное время удерживания САР были оценены с использованием 0,5 % изопропанола в 0,1 % уксусной кислоте в соотношении вода:метанол. Извлечение находилось в диапазоне от 93,1 до 108,0 % при повторяемости менее 9,2 % и внутрилабораторной воспроизводимости менее 13,1 %.

В исследовании M. Britzi и F. Schwartsburd описывается определение хлорамфеникола в коровьем и овечьем молоке с использованием жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией [55]. Метод позволяет обнаруживать и количественно определять антибиотик при его максимальных пределах остатков (0,3 мкг/кг). Было обнаружено, что добавление аскорбиновой кислоты в образцы молока перед стадией экстракции имеет решающее значение для воспроизводимости и интенсивности. Метод состоит из одной стадии экстракции ацетонитрилом и коммерчески доступной смесью солей с последующим выпариванием надосадочной жидкости и восстановлением. Метод прошел валидацию в соответствии с требованиями Решения Комиссии ЕС 2002/657/ЕС. Точность метода находилась в диапазоне 89–108 %, а коэффициенты вариации оценки точности изменялись от 3 до 16 %.

Группой ученых из Китая был разработан метод, основанный на сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

в сочетании с твердофазной экстракцией для определения запрещенных ветеринарных препаратов [56]. Основные факторы, влияющие на отклик, извлечение и чувствительность метода, такие как тип и значения рН экстракционного растворителя, разбавляющий раствор для аналитов, тип хроматографической колонки, а также тип и доля подвижной фазы, были оптимизированы во время предварительной обработки проб и приборного анализа. Образцы гидролизовали и диспергировали в 0,1 моль/л фосфатных буферных растворах (рН 9,0) и экстрагировали ацетонитрилом. Экстракт дополнительно экстрагировали этилацетатом. После центрифугирования супернатант этилацетат концентрировали почти досуха в азоте при температуре 40 °С. Остаток растворяли в 0,3 мл метанола с последующим добавлением 5,7 мл раствора фосфатного буфера. После встряхивания растворы очищали и обогащали на колонке Oasis HLB SPE. Целевые аналиты разделяли на хроматографической колонке ACQUITY UPLC BEH C18 (100×2,1 мм, 1,7 мкм) при температуре колонки 40 °С со скоростью потока 0,4 мл/мин. Объем инъекции составлял 10 мкл. Градиентное элюирование проводили метанолом и 0,1 % водным раствором муравьиной кислоты в качестве подвижных фаз. Мониторинг множественных реакций (MRM) проводили в режимах положительной и отрицательной ионизации электрораспылением. Для количественного анализа использовали метод изотопного внутреннего стандарта. В оптимальных условиях каждый аналит показал хорошую линейную зависимость в каждом диапазоне, а коэффициент корреляции (R^2) был больше 0,99. Пределы обнаружения (LOD) варьировались от 0,050 до 0,50 мкг/кг, а пределы количественного определения (LOQ) – от 0,20 до 1,5 мкг/кг. Описанный метод прост в использовании, чувствителен и точен.

На основании проведенного литературного анализа можно сделать вывод о том, что ВЭЖХ широко используется для анализа хлорамфеникола в пищевых матрицах – молоке и молочной продукции. Это избирательная и эффективная система для обнаружения остаточной концентрации амфениколов. Однако, несмотря на все положительные качества рассмотренных методов, недостатком остается ограниченная доступность аналитического оборудования (хроматографов) в лабораториях из-за высокой стоимости и нехватки специализированного персонала для его эксплуатации.

Выводы

Анализ научных публикаций по исследуемой теме показал, что молоко и продукты его переработки представляют собой сложные матрицы, требующие специальных этапов подготовки проб

для анализа содержания в них антибиотиков. В результате этого высок риск изменения пределов обнаружения веществ, их качественного определения и селективности. Описаны основные методы определения амфениколов и их метаболитов в молоке: качественные (скрининг-методы) и количественные (ВЭЖХ).

Наиболее перспективными скрининг-методами амфениколов в молоке и продуктах его переработки являются аптасенсоры. Они могут распознавать широкий спектр мишеней с высоким сродством. Пределы детализации большинства сконструированных аптасенсоров показали, что они могут обнаруживать низкие уровни амфениколов (ниже установленного значения предельно-допустимого уровня). Однако некоторые проблемы все еще существуют. Например, селективность и производительность в зависимости от состояния образца (рН, температура, ионная сила и вязкость).

Установлено, что востребованным количественным методом для разделения и обнаружения амфениколов в пищевых продуктах является жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Исследования в области определения остаточного количества антибиотиков в продуктах животноводства направлены на процесс оптимизации пробоподготовки. Следует разрабатывать методики, которые позволят сократить этап очистки и обеспечить выход продукта и степень его очистки. Очевидна необходимость в усовершенствованных быстрых и чувствительных методах непрерывного мониторинга уровней амфениколов в пищевых матрицах.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в подготовке и написании статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All the authors contributed equally to the study and bear equal responsibility for information published in this article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. da Cunha BR, Fonseca LP, Calado CRC. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics*. 2019;8(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>
2. Low CX, Tan LT-H, Mutalib N-SA, Pusparajah P, Goh B-H, Chan K-G, et al. Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review. *Antibiotics*. 2020;10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050578>
3. Gould K. Antibiotics: From prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(3):572–575. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>
4. Pham JV, Yilma MA, Feliz A, Majid MT, Maffetone N, Walker JR, et al. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>
5. Jukes TH. *Antibiotics in nutrition*. New York: Medical Encyclopedia, 1955. 128 p.
6. Bacanlı M, Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;125:462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
7. Baynes RE, Dedonder K, Kissell L, Mzyk D, Marmulak T, Smith G, et al. Health concerns and management of select veterinary drug. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;88:112–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>
8. Hutchings M, Truman A, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 2019;51:72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
9. Mackenzie LE. Antibiotics in agriculture: the retail customer perspective. *Australian Veterinary Journal*. 2019;97(8):292–294. <https://doi.org/10.1111/avj.12822>
10. Shul'ga NN, Shul'ga IS, Plavshak LP. Antibiotics in animal husbandry – ways to solve the problem. *Trends in the Development of Science and Education*. 2018;(35–4):52–55. (In Russ.). <https://doi.org/10.18411/lj-28-02-2018-68>
11. Mehl A, Schmidt LJ, Schmidt L, Morlock GE. High-throughput planar solid-phase extraction coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry via the autoTLC-MS interface for screening of 66 multi-class antibiotic residues in food of animal origin. *Food Chemistry*. 2021;351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129211>
12. Panin AN, Komarov AA, Kulikovskiy AV, Makarov DA. Problem of antimicrobial resistance of zoonotic bacteria. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2017;(5):18–24. (In Russ.).
Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных / А. Н. Панин [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 5. С. 18–24.
13. Yang Y, Babich OO, Sukhikh SA, Zimina MI, Milentyeva IS. Identification of total aromas of plant protein sources. *Foods and Raw Materials*. 2020;8(2):377–384. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-2-377-384>
14. Pastor-Belda M, Campillo N, Arroyo-Manzanares N, Hernández-Córdoba M, Viñas P. Determination of amphenicol antibiotics and their glucuronide metabolites in urine samples using liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2020;1146. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122122>
15. Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, et al. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 7: Amphenicols: florfenicol and thiamphenicol. *EFSA Journal*. 2021;19(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6859>
16. Galyautdinova GG, Malanov AV, Balyмова MV, Mukhammetshina AG, Egorov VI. Indication of antibiotics of zincbacetracine in feed by HPLC method. *Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*. 2020;242(2):36–39. (In Russ.). <https://doi.org/10.31588/2413-4201-1883-242-2-36-40>
17. Sharma C, Rokana N, Chandra M, Singh BP, Gulhane RD, Gill JPS, et al. Antimicrobial resistance: Its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018;4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00237>
18. Alhaji NB, Aliyu MB, Ghali-Mohammed I, Odetokun IA. Survey on antimicrobial usage in local dairy cows in North-central Nigeria: Drivers for misuse and public health threats. *PLoS ONE*. 2019;14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224949>
19. Chiesa LM, DeCastelli L, Nobile M, Martucci F, Mosconi G, Fontana M, et al. Analysis of antibiotic residues in raw bovine milk and their impact toward food safety and on milk starter cultures in cheese-making process. *LWT*. 2020;131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109783>
20. Fedorova MA. The state of the milk and dairy products market abroad and the impact of the coronavirus pandemic on it. *Problems of modern agricultural science: Proceedings of the international scientific conference; 2021; Krasnoyarsk*. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State Agrarian University; 2021. p. 327–375. (In Russ.).
Федорова М. А. Состояние рынка молока и молочной продукции за рубежом и влияние на него пандемии коронавируса // Проблемы современной аграрной науки: материалы международной научной конференции. Красноярск, 2021. С. 372–375.

21. Galkin AV, Trepalina EA. Identifying pathogens of mastitis and their sensitivity to antibiotics. *Efficient Animal Husbandry*. 2017;137(7):22–23. (In Russ.).
Галкин А. В., Трепалина Е. А. О выявлении возбудителей мастита и их чувствительности к антибиотикам // Эффективное животноводство. 2017. Т. 137. № 7. С. 22–23.
22. Potekhin AV, Rusaleyev VS. Monitoring of antibiotic resistance of *Acinobacillus pleuropneumoniae* isolated in the Russian Federation in 2012–2014. 2016;16(1):24–29. (In Russ.).
Потехин АВ, Русалеев ВС. Мониторинг антибиотикорезистентности изолятов *Acinobacillus pleuropneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012–2014 гг. // Ветеринария сегодня. 2016. Т. 16. № 1. С. 24–29.
23. Shul'ga NN, Shul'ga IS, Plavshak LP. Antibiotics against humans. *БИО*. 2019;226(7):6–12. (In Russ.).
Шульга Н. Н., Шульга И. С., Плавшак Л. П. Антибиотики против человека // БИО. 2019. Т. 226. № 7. С. 6–12.
24. Ghosh D, Veeraraghavan B, Elangovan R, Vivekanandan P. Antibiotic resistance and epigenetics: More to it than meets the eye. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.02225-19>
25. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence – Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*. 2020;21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
26. Rysanova RM, Kokanov SK, Palamarchuk VV. Monitoring the degree of contamination of milk by residual quantities of antibiotics manufacturers Kostanay region. *Agricultural Technologies*. 2019;1(1):33–41. (In Russ.).
Рыщанова Р. М., Коканов С. К., Паламарчук В. В. Мониторинг степени загрязнения молока остаточными количествами антибиотиков производителей Костанайской области // Сельскохозяйственные технологии. 2019. Т. 1. № 1. С. 33–41.
27. Quintanilla P, Beltrán MC, Molina A, Escriche I, Molina MP. Characteristics of ripened Tronchón cheese from raw goat milk containing legally admissible amounts of antibiotics. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(4):2941–2953. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15532>
28. Akter MS, Islam R, Shoeb M, Nahar N. Determination of chloramphenicol in meat samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Science and Nutrition*. 2021;9(10):5670–5675. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2530>
29. Rezaee M, Khalilian E. Application of ultrasound-assisted extraction followed by solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of chloramphenicol in chicken meat. *Food Analytical Methods*. 2018;11(3):759–767. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1048-2>
30. Wu S-W, Ko J-L, Liu B-H, Yu F-Y. A sensitive two-analyte immunochromatographic strip for simultaneously detecting aflatoxin M1 and chloramphenicol in milk. *Toxins*. 2020;12(10). <https://doi.org/10.3390/toxins12100637>
31. Sun Y, Wei T, Jiang M, Xu L, Xu Z. Voltammetric sensor for chloramphenicol determination based on a dual signal enhancement strategy with ordered mesoporous carbon@polydopamine and β -cyclodextrin. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2018;255:2155–2162. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.016>
32. Doğan YN, Pamuk Ş, Gürler Z. Chloramphenicol and sulfonamide residues in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fish from aquaculture farm. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(33):41248–41252. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09942-3>
33. Zhao M, Li X, Zhang Y, Wang Y, Wang B, Zheng L, et al. Rapid quantitative detection of chloramphenicol in milk by microfluidic immunoassay. *Food Chemistry*. 2021;339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127857>
34. Duan Y, Wang L, Gao Z, Wang H, Zhang H, Li H. An aptamer-based effective method for highly sensitive detection of chloramphenicol residues in animal-sourced food using real-time fluorescent quantitative PCR. *Talanta*. 2017;165:671–676. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.090>
35. Ma P, Sun Y, Khan IM, Gu QH, Yue L, Wang Z. Structure-switching fluorescence aptasensor for sensitive detection of chloramphenicol. *Microchimica Acta*. 2020;187(9). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04471-9>
36. Zhang Z, Oni O, Liu J. New insights into a classic aptamer: binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(13):7593–7601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx517>
37. Ong JJ, Pollard TD, Goyanes A, Gaisford S, Elbadawi M, Basit AW. Optical biosensors – Illuminating the path to personalized drug dosing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021;188. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113331>
38. Mehlhorn A, Rahimi P, Joseph Y. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review. *Biosensors*. 2018;8(2). <https://doi.org/10.3390/bios8020054>
39. Yan C, Zhang J, Yao L, Xue F, Lu J, Li B, et al. Aptamer-mediated colorimetric method for rapid and sensitive detection of chloramphenicol in food. *Food Chemistry*. 2018;260:208–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.014>
40. Sadeghi AS, Ansari N, Ramezani M, Abnous K, Mohsenzadeh M, Taghdisi SM, et al. Optical and electrochemical aptasensors for the detection of amphenicols. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;118:137–152. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.045>

41. Abnous K, Danesh NM, Ramezani M, Emrani AS, Taghdisi SM. A novel colorimetric sandwich aptasensor based on an indirect competitive enzyme-free method for ultrasensitive detection of chloramphenicol. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;78:80–86. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.028>
42. Zhu J-H, Feng Y-G, Wang A-J, Mei L-P, Luo X, Feng J-J. A signal-on photoelectrochemical aptasensor for chloramphenicol assay based on 3D self-supporting AgI/Ag/BiOI Z-scheme heterojunction arrays. *Biosensors and Bioelectronics*. 2021;181. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113158>
43. Sa-nguanprang S, Phuruangrat A, Bunkoeda O. An optosensor based on a hybrid sensing probe of mesoporous carbon and quantum dots embedded in imprinted polymer for ultrasensitive detection of thiamphenicol in milk. *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022;264. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120324>
44. Khoshbin Z, Verdian A, Housaindokht MR, Izadyar M, Rouhbakhsh Z. Aptasensors as the future of antibiotics test kits-a case study of the aptamer application in the chloramphenicol detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;122:263–283. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.060>
45. Rizwan M, Mohd-Naim NF, Ahmed MU. Trends and advances in electrochemiluminescence nanobiosensors. *Sensors*. 2018;18(1). <https://doi.org/10.3390/s18010166>
46. Amiripour F, Ghasemi S, Azizi SN. Design of turn-on luminescent sensor based on nanostructured molecularly imprinted polymer-coated zirconium metal-organic framework for selective detection of chloramphenicol residues in milk and honey. *Food Chemistry*. 2021;347. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129034>
47. Śniegocki T, Sell B, Giergiel M, Posyniak A. QuEChERS and HPLC-MS/MS combination for the determination of chloramphenicol in twenty two different matrices. *Molecules*. 2019;24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030384>
48. Vuran B, Ulusoy HI, Sarp G, Yilmaz E, Morgül U, Kabir A, et al. Determination of chloramphenicol and tetracycline residues in milk samples by means of nanofiber coated magnetic particles prior to high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Talanta*. 2021;230. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122307>
49. Kikuchi H, Sakai T, Teshima R, Nemoto S, Akiyama H. Total determination of chloramphenicol residues in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2017;230:589–593. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.071>
50. Kurchenko VP, Simonenko ES, Sushynskaya NV, Halavach TN, Petrov AN, Simonenko SV. HPLC identification of mare's milk and its mix with cow's milk. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2021;51(2):402–412. (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-2-402-412>.
51. Guidi LR, Tette PAS, Fernandes C, Silva LHM, Gloria MBA. Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food. *Talanta*. 2017;162:324–338. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.068>
52. Xie Y, Hu Q, Zhao M, Cheng Y, Guo Y, Qian H, et al. Simultaneous determination of erythromycin, tetracycline, and chloramphenicol residue in raw milk by molecularly imprinted polymer mixed with solid-phase extraction. *Food Analytical Methods*. 2018;11(2):374–381. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1008-x>
53. Patyra E, Kwiatek K. Quantification and analysis of trace levels of phenicols in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*. 2020;83(6):715–723. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03890-3>
54. Amelin VG, Bol'shakov DS. Simultaneous determination of the residual amounts of chloramphenicol and chloramphenicol palmitate in food products using liquid chromatography-mass spectrometry. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2020;61(6):420–428. (In Russ.).
- Амелин В. Г., Большаков Д. С. Одновременное определение остаточного количества хлорамфеникола и хлорамфеникола пальмитата в пищевых продуктах с помощью жидкостной хромато - масс - спектрометрии // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2020. Т. 61. № 6. С. 420–428.
55. Britzi M, Schwartsburd F. Development and validation of a high-throughput method for the determination of eight non-steroidal anti-inflammatory drugs and chloramphenicol in milk, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Methods*. 2019;1. <https://doi.org/10.35840/2633-8912/2405>
56. Liu B, Xie J, Zhao Z, Wang X, Shan X. Simultaneous determination of 11 prohibited and restricted veterinary drugs and their metabolites in animal-derived foods by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *Chinese Journal of Chromatography*. 2021;39(4):406–414.