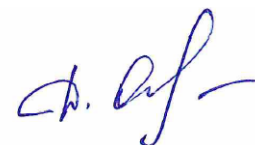


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Кемеровский государственный университет»

На правах рукописи



ДОЛГАНЮК ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ
МЕТОДА КОНТРОЛЯ АМФЕНИКОЛОВ ДЛЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ
МОЛОКА И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ**

4.3.5 Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Просеков Александр Юрьевич

Кемерово 2023

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР..... | 10 |
| 1.1 Антибиотики группы амфениколы. Общие сведения..... | 10 |
| 1.2 Использование амфениколов в животноводстве..... | 16 |
| 1.3 Влияние антибиотиков группы амфениколы на биобезопасность молока и молочной продукции..... | 19 |
| 1.4 Методы определения амфениколов в молоке и молочной продукции..... | 27 |
| 1.5 Обоснование основных направлений исследований, их цель и задачи..... | 38 |
| ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 40 |
| 2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента..... | 40 |
| 2.2 Объекты и методы..... | 43 |
| 2.3 Методы проведения исследований..... | 46 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..... | 57 |
| 3.1 Мониторинг биобезопасности молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области – Кузбасса по содержанию антибиотиков..... | 57 |
| 3.2 Изучение дифференцированного влияния антибиотиков амфениколов на сырое молоко..... | 63 |
| 3.3 Изучение влияния антибиотиков амфениколов на метаболизм молочнокислых бактерий..... | 78 |
| 3.4 Определение влияния антибиотика на качество и безопасность кисломолочных продуктов..... | 87 |
| ГЛАВА 4. ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 92 |

| | |
|--|------------|
| 4.1 Оптимизация метода определения антибиотиков группы амфениколов методом ВЭЖХ-МС/МС..... | 92 |
| 4.2 Сравнительный анализ методов определения антибиотиков группы амфениколов методом ВЭЖХ-МС/МС | 105 |
| 4.3 Валидация метода определения антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции | 109 |
| 4.4 Практические рекомендации применения оптимизированного метода определения антибиотиков группы амфениколы методом ВЭЖХ-МС/МС..... | 121 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 123 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 125 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ..... | 159 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БГКП – бактерии группы кишечной палочки;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией;

ГОСТ – государственный стандарт;

ГХ-МС – масс-спектрометрия;

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов;

КОЕ – колониобразующая единица, живые клетки;

КРС – крупный рогатый скот;

МКБ – молочнокислые бактерии;

ОФС – общая фармакопейная статья;

ПДК – предельно допустимая концентрация;

СОМО – сухой обезжиренный молочный остаток;

ТР ТС – технический регламент Таможенного союза;

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФЭ – твердофазная экстракция

QuEChERS – quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (быстрый, простой, дешевый, эффективный, точный и надежный)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Молоко и молочные продукты занимают неотъемлемую часть в рационе людей. Это объясняется содержанием в их составе необходимых питательных веществ для нормального функционирования организма всех возрастных групп населения. Одним из основных показателей качества молочных продуктов является отсутствие антибиотиков в сыром молоке [24, 68]. По данным Роспотребнадзора, сырое молоко как продукт животного происхождения наиболее подвержен загрязнению остаточным количеством антибиотиков группы амфениколы. Антибиотики группы, к которой относятся флорфеникол, флорфеникол амин и наиболее распространенный хлорамфеникол (левомицетин), широко используются в ветеринарии для лечения инфекций у животных из-за их широкого спектра действия против большинства патогенов, а также доступности и невысокой стоимости [53, 128]. Амфениколы медленно выводятся из организма животного и долго сохраняют свои активные свойства при хранении продуктов, тем самым оказывая негативное воздействие на качество и основные свойства готового продукта. Наличие остаточных количеств антибиотиков в молоке и продуктах его переработки может создавать серьезные риски для здоровья потребителей, включая развитие бактериальной резистентности в организме, поражение печени, аллергические реакции и т. д. [126]. Поэтому во многих странах этот вопрос рассматривается как серьезная проблема общественного здравоохранения [128].

Для обеспечения безопасности пищевых продуктов и защиты здоровья потребителей установлены максимальные пределы остаточного содержания амфениколов в молоке и молочных продуктах [108]. Согласно ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» концентрация фармакологической группы амфениколов (хлорамфеникола) в молоке не должна превышать значения $0,0003 \text{ мг/см}^3$ [118]. Исходя из этого, важно определить точное значение остаточных количеств антибактериальных веществ.

Молоко является сложной биологической системой, состав которой влияет на точность проводимых исследований. По этим причинам необходимы чувствительные и специфичные методы для выявления и количественного определения остатков амфениколов в молоке [19, 121]. Сегодня разработано множество технологий для анализа остатков антибиотиков в пищевых продуктах: от быстрого скрининга до подтверждающих методов. Наиболее востребованными для лабораторной диагностики и проведения научных исследований антибиотиков являются хроматографические методы в сочетании с масс-спектрометрией [134]. Несмотря на очевидный прогресс в области аналитической химии, возможность количественного определения антибиотиков с низким значением концентрации остается сложной задачей. Поэтому важна разработка нового подхода к определению антибиотиков методом жидкостной хроматографии для более точного и статистически значимого скрининга антибиотиков в продуктах животного происхождения.

В связи с этим оптимизация метода контроля амфениколов является актуальной проблемой для биобезопасности молока и молочной продукции.

Степень разработанности темы исследования. Вклад в развитие науки о биобезопасности молока и молочной продукции отражен в трудах российских и зарубежных ученых: В. Г. Амелина, И. В. Буяновой, Г. Б. Гаврилова, Н. Б. Гавриловой, В. И. Ганиной, Т. М. Гиро, К. С. Голохваста, Н. И. Дунченко, А. Б. Лисицына, А. А. Майорова, Л. А. Остроумова, Г. М. Свириденко, Ю. Я. Свириденко, Е. М. Сербы, М. И. Сложенкиной, И. С. Хамагаевой, А. Г. Храмцова, И. М. Чернухи, M. Virto, M. Britzi, H. Nakk, M. Gbylik-Sikorska, J. Giraldo, N. László, M. Zhao и др.

Цель и задачи исследований. Целью работы является обоснование оптимизации метода контроля антибиотиков группы амфениколов путем определения характера их влияния на биобезопасность молока и молочной продукции.

Задачи исследования:

– провести мониторинг биобезопасности молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области – Кузбасса по содержанию антибиотиков;

- определить влияние антибиотиков на основные физико-химические показатели и изучить характер их дифференциального воздействия на микрофлору сырого молока;
- изучить в модельных экспериментах влияние антибиотиков на динамику развития заквасочных культур молочнокислых бактерий;
- определить влияние антибиотиков на качество и безопасность кисломолочных продуктов;
- определить оптимальные масс-спектрометрические параметры детектирования и хроматографические параметры разделения антибиотиков группы амфениколов;
- провести сравнительный анализ методов определения амфениколов и валидацию оптимизированного метода их контроля в молоке и молочной продукции;
- провести лабораторную апробацию оптимизированного метода контроля антибиотиков группы амфениколов.

Научная новизна работы заключается в следующем:

- установлено влияние антибиотиков амфениколов, содержащихся в сыром молоке, на его физико-химические и микробиологические показатели;
- определен ингибирующий потенциал антибиотиков амфениколов в метаболических процессах заквасочных культур молочнокислых бактерий на уровне ПДК;
- подтверждено, что присутствие хлорамфеникола на уровне ПДК в исходном сырье (молоке) оказывает отрицательное влияние на качество и безопасность кисломолочных продуктов;
- установлены рациональные значения масс-спектрометрических и хроматографических параметров определения антибиотиков амфениколов;
- подтверждена эффективность оптимизированной методики на реальных пищевых продуктах и проведена ее валидация согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 и Решению Комиссии 2002/657/ЕС.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в углублении знаний в вопросах изучения дифференцированного влияния антибиотиков амфениколов на микробиоту

молока и молочной продукции при различных заданных условиях. Рассмотрена степень влияния антибиотиков на метаболизм заквасочных культур, качество и безопасность кисломолочных продуктов и молока.

Практическая значимость. Подобраны оптимальные масс-спектрометрические параметры детектирования и условия хроматографического разделения антибиотиков группы амфениколов. Осуществлена валидация методики по таким параметрам, как селективность, линейность, правильность и внутрилабораторная прецизионность. Разработаны методические указания «Определение остаточного содержания амфениколов в молоке и молочной продукции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» (МУК 05.01-03-05/2022).

Методология и методы исследования. Для реализации данной работы использовались общенаучные методы исследования: методы анализа и синтеза информации, биотехнологическое культивирование молочнокислых бактерий, методы аналитической химии и микробиологические методы анализа.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты мониторинга биобезопасности молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области – Кузбасса по содержанию антибиотиков;
- научные результаты и характер влияния антибиотиков группы амфениколов на основные физико-химические и микробиологические показатели сырого молока;
- особенности влияния антибиотиков амфениколов на метаболизм молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei*;
- характер влияния антибиотиков на безопасность кисломолочных продуктов;
- оптимизированные параметры масс-спектрометрического детектирования и условия хроматографического разделения антибиотиков группы амфениколов.

Степень достоверности и апробации работы. Основные результаты работы представлены на различных конференциях, конкурсах, форумах и фестивалях международного, всероссийского и регионального уровней: III научно-практическая

конференция с международным участием (Киров, 2021); Актуальные вопросы аграрной науки (Ульяновск, 2021); IX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2021); Актуальные научно-технические средства и сельскохозяйственные проблемы (Кемерово, 2021); III национальная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых (Кемерово, 2021); Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение (Воронеж, 2022); Инновационный конвент «Кузбасс: образование, наука, инновации» (Кемерово, 2022).

Соответствие паспорту научной специальности. Проведенные исследования и содержание диссертационной работы соответствуют п. 3, 26, 27 паспорта научной специальности 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано пятнадцать печатных работ, из которых две статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, три статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, четырех глав, заключения, списка использованных источников и приложений. Основное содержание работы изложено на 121 странице машинописного текста, содержит 29 таблиц, 41 рисунок и 6 формул. Список использованных источников включает 275 наименований.

ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

В литературном обзоре рассмотрены общие сведения, классификация и свойства антибиотиков группы амфениколы. Проанализировано основное применение антибиотиков в сельском хозяйстве и их влияние на качество молока и молочной продукции. Описаны актуальные методы определения остаточного содержания амфениколов в молоке и молочной продукции. Сформирована цель и задачи для ее реализации в ходе данной диссертационной работы.

1.1 Антибиотики группы амфениколы. Общие сведения

С открытия пенициллина микробиологом Александром Флемингом (1928 г.) наступила новая эра – эра борьбы с патогенными микроорганизмами [203, 230]. До 1928 г. антибиотики назначались пациентам исключительно в качестве профилактического средства [73, 154]. В связи с событиями, происходящими в мире в 1940-х гг., появилась необходимость в увеличении производства мяса. Следовательно, стали проводиться исследования в области питания животных и науки о кормах [90, 186]. E. L. Stokstad обнаружил, что неизвестный к тому времени компонент, содержащийся в побочных продуктах ферментации *Streptomyces aureofaciens*, способствовал увеличению скорости роста цыплят [253]. В дальнейшем ученые провели исследования, которые способствовали идентификации данного компонента, которым стал антибиотик, производимый *Streptomyces aureofaciens*. В результате проводимых исследований было доказано, что добавление небольшого количества антибактериальных препаратов в корма животных стимулирует увеличение роста молочных коров, кур и свиней и способствует предотвращению развития различных болезней бактериального происхождения [52, 131, 181]. Результаты данных открытий привели к обширному использованию антибиотиков не только в качестве

лечебных и профилактических целей, но и в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных [6, 9].

Антибиотики – это противомикробные препараты, способные подавлять рост бактерий за счет бактерицидного или бактериостатического действия [130]. Наиболее часто именно производители животноводческой продукции являются инициаторами использования антибиотиков для наращивания массы животных, в результате чего в конечном продукте содержится антибиотик [196, 198]. Наличие антибиотиков и их остаточных следов в продуктах животного происхождения является одной из существенных проблем в обеспечении безопасности пищевых продуктов [115, 128, 178].

Антибактериальные препараты могут циркулировать в организме животного в течение длительного времени, накапливаясь и откладываясь в организме. Это приводит к тому, что антибиотики сохраняют свою активную форму в таких продуктах животного происхождения, как молоко, мясо, яйца и т. д. [6, 128, 139]. При употреблении человеком данной продукции антибиотики попадают в организм и приводят к появлению устойчивости патогенных и условно-патогенных штаммов к его действию. Таким образом формируется одна из самых опасных угроз здоровой жизнедеятельности человека – антибиотикорезистентность [119, 128, 151, 219].

Амфениколы представляют собой антибиотики широкого спектра действия, способные влиять как на грамположительные, так и на грамотрицательные микроорганизмы, т. е. не допустить развитие инфекционных заболеваний, таких как менингококковая инфекция, хламидиоз, брюшной тиф, бруцеллез, сальмонеллез и ряд других болезней [172, 179]. Высокая противомикробная активность и относительно невысокая стоимость делают антибиотики данной группы широко востребованными в ветеринарной практике [53, 78, 173]. Ряд проводимых исследований показал, что добавление антибиотиков амфеникольной группы способствует стимулированию развития и роста животных, снижает падеж молодняка и приводит к сокращению объемов потребления кормов на 5–10 % [131, 195, 211].

По своему строению рассматриваемая группа антибиотиков является производными дихлоруксусной кислоты, состоящими из ароматического ядра с алкильной группой в пара-положении и аминопропандиольной цепью (рисунок 1.1.1) [7, 37, 175].

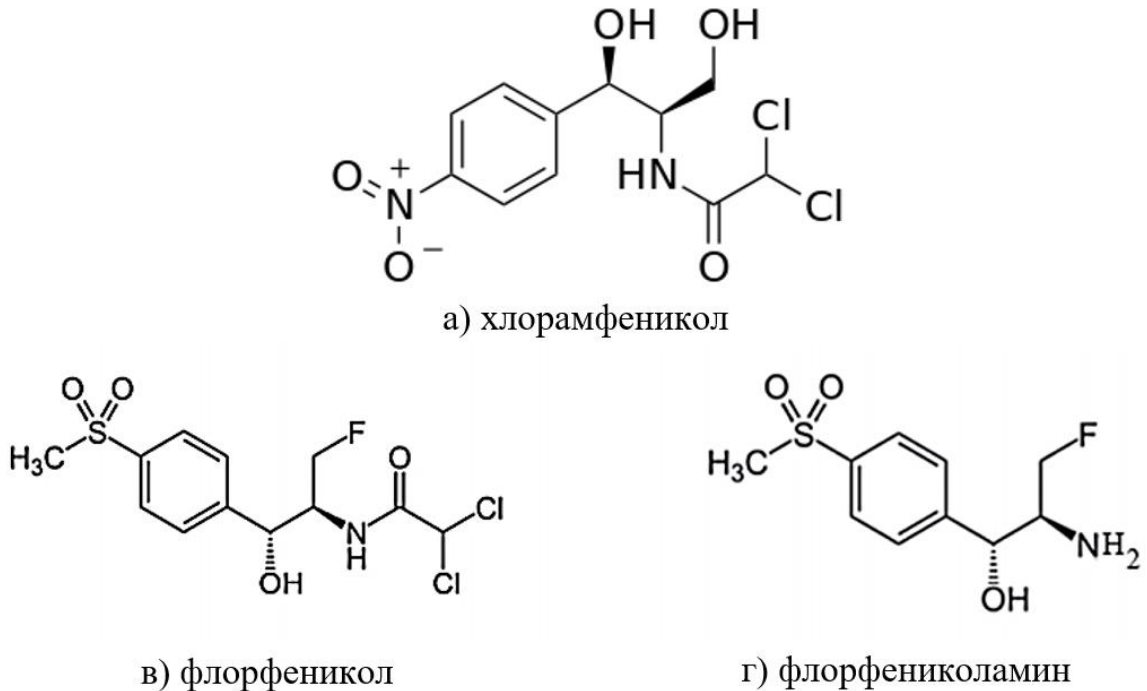


Рисунок 1.1.1 – Структурные формулы амфениколов и их производных [128]

Амфениколы используются как в медицине, так и в ветеринарии из-за их широкого спектра действий в отношении большинства возбудителей, легкой доступности и низкой стоимости препаратов [143, 162].

Наибольший интерес среди всей группы антибиотиков амфениколов вызывает хлорамфеникол, т. к. обладает наибольшей токсичностью в отношении организма как человека, так животного, а также запрещен к использованию в животноводстве во многих странах Евросоюза (ЕС) [173].

Хлорамфеникол был открыт в 1947 г. как продукт жизнедеятельности, выделяемый бактерией *Streptomyces venezuelae*, обнаруженной в почве и компосте [37, 175, 181]. Эффективность антибиотика была продемонстрирована с впечатляющими результатами во время двух вспышек сыпного тифа в Боливии и Малайзии в 1948 г. [176].

В 1949 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США одобрило использование хлорамфеникола в качестве первого антибактериального препарата широкого спектра действия. Он был легко синтезирован и недорог в производстве, его можно было вводить перорально, парентерально или местно [17, 135, 184]. Быстрая диффузия хлорамфеникола в ткани и жидкости в сочетании с его широким антимикробным спектром привела к его быстрому признанию во всем мире. В 1950-х гг. хлорамфеникол широко использовался для лечения инфекционных заболеваний, начиная от простуды и бронхита и заканчивая тяжелыми инфекциями, такими как бактериальный менингит [84, 142]. В 1960-х гг. после нескольких лет интенсивного использования популярность хлорамфеникола начала снижаться, когда токсичность была связана с двумя различными эффектами на костный мозг [110, 141].

Хлорамфеникол (левомицетин) – синтетический антибиотик широкого спектра действия со структурой *n*-нитрофенильной группой (при С-1) и *N*-дихлорацетильный заместитель (при С-2), присоединенный к 1,3-пропандиолу с двумя хиральными центрами (С-1 и С-2). Благодаря таким сочетаниям из четырех возможных диастереоизомеров он действует как противомикробный медиатор и антибактериальное средство [73, 140, 175].

Хлорамфеникол является высокостабильным антибиотиком, который можно хранить в течение длительного времени при комнатной температуре. Он амфифилен и неионизирован при физиологическом значении рН [29]. Антибиотик может проходить через биологические мембраны для достижения внутриклеточных бактерий и способен легко преодолевать гематоэнцефалический барьер [182, 207].

Механизм действия. Хлорамфеникол – сильный ингибитор синтеза белка за счет связывания с рибосомной субъединицей 50S (рисунок 1.1.2), а также проявляет активность против большинства грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов [37, 69, 73, 217].

Хлорамфеникол блокирует превращение аминокислот в растущую пептидную цепь и препятствует конфигурации пептидной связи [17]. Затем пептидная связь внезапно насыщается, а конфигурация пептидной связи изменяется таким

образом, что синтез бактериального белка прекращается и заканчивается продуцирование бактериальных клеток [115, 129, 242].

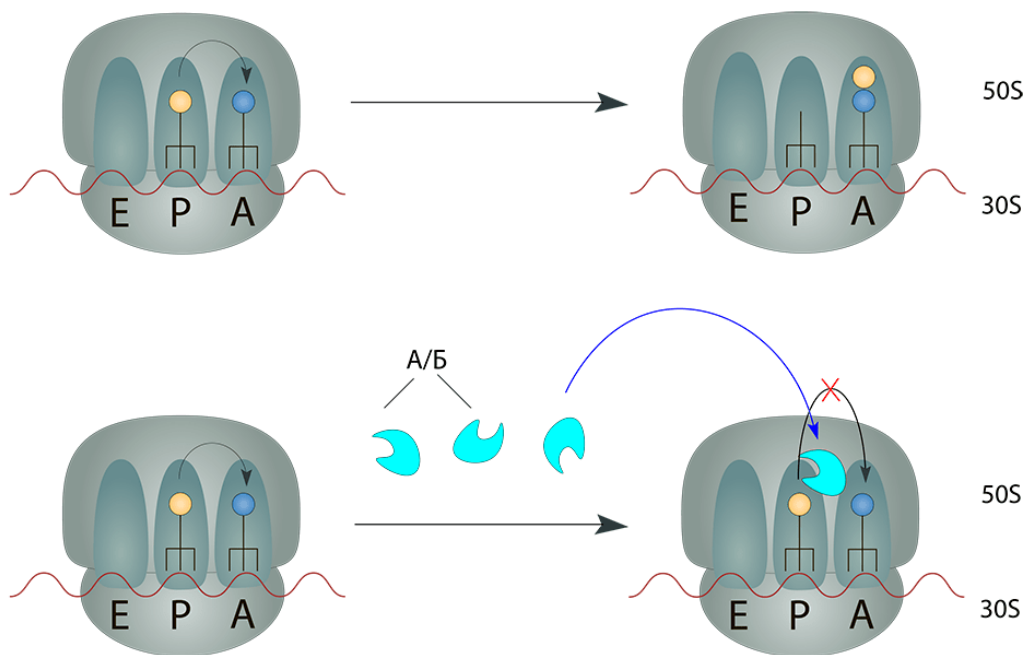


Рисунок 1.1.2 – Механизм действия хлорамфеникола на клеточном уровне [61]

Устойчивость бактерий к хлорамфениколу. Как и в случае со всеми антибиотиками, процент бактерий, выработавших устойчивость к хлорамфениколу, растет. Устойчивость к антибиотику развивается медленно и поэтапно [7, 132]. В клинических бактериальных изолятах высокий уровень плазмид-опосредованной резистентности отражает продукцию хлорамфениколацетилтрансферазы (кодируемой геном CAT) и приводит к ацетилированию молекулы, которая больше не может связываться с рибосомой. Могут быть задействованы и другие инактивирующие ферменты [56]. У резистентных грамотрицательных бактерий хлорамфениколацетилтрансфераза является конститутивным ферментом, у грамположительных организмов этот фермент индуцибелен (рисунок 1.1.3) [17, 151, 153].

Выработка микроорганизмами такого механизма устойчивости к воздействию антибиотика связана с бесконтрольным использованием препарата рассматриваемой группы как в медицинской практике, так и в животноводстве [241, 251]. Устойчивость к антибиотикам развивается у бактерий, а не у людей или животных. Эти бактерии могут заражать людей и животных, вызванные ими

инфекции лечить труднее, чем инфекции от бактерий, не имеющих такой устойчивости [141, 149, 188].

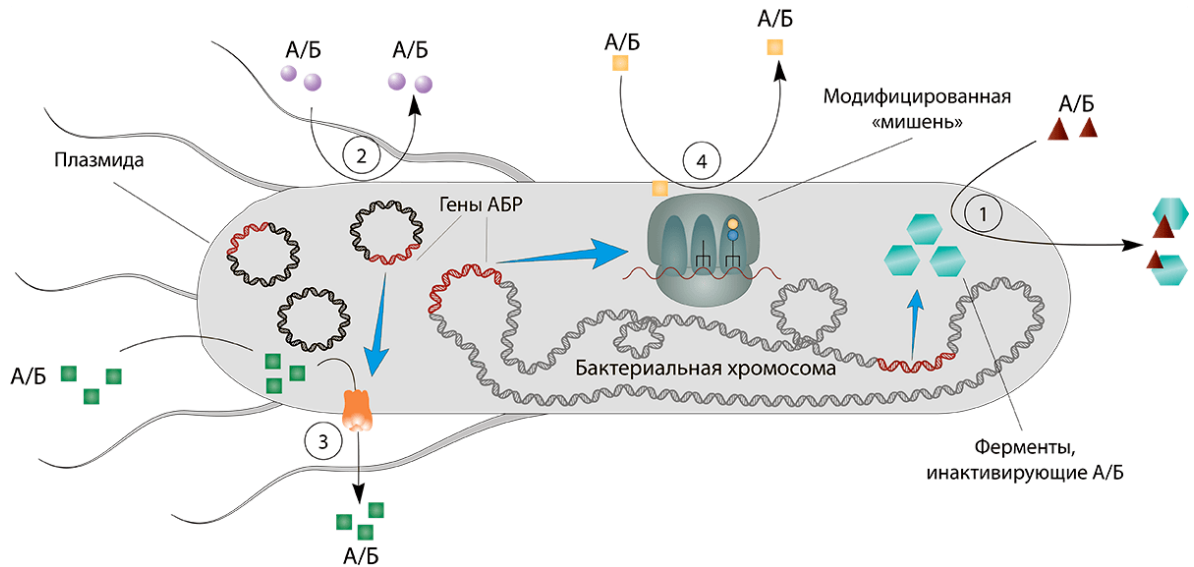


Рисунок 1.1.3 – Механизмы устойчивости бактерий к хлорамфениколу:

- 1 – образование ферментов, инактивирующих антибиотик;
- 2 – уменьшение накопления антибиотика путем снижения проницаемости оболочки бактерии;
- 3 – усиленная элиминация (выведение из клетки) антибиотика – эффлюкс;
- 4 – модификация мишеней антибиотиков [61]

Побочные эффекты. Основные побочные эффекты, обнаруженные при попадании хлорамфеникола в организм человека в превышенных концентрациях, включают необратимое угнетение костного мозга, апластическую анемию и лейкомию [175, 181]. Эпидемиологические исследования показывают, что от 1:30000 до 1:45000 пациентов, получающих лечение хлорамфениколом, обнаруживают лейкоз, и, основываясь на эпидемиологических исследованиях, хлорамфеникол сильно коррелирует с лейкогенезом [150, 241, 242].

1.2 Использование амфениколов в животноводстве

Спрос на животный белок для потребления человеком растет во всем мире большими темпами. Современные методы животноводства связаны с регулярным использованием различных противомикробных препаратов [62, 72]. Несмотря на потенциальные последствия устойчивости к таким препаратам, об уменьшении их использовании в животноводстве говорить пока не приходится [6, 73, 165].

По данным журнала Science, в 2013 г. в мировом животноводстве было использовано 130 тыс. т антибиотиков, в 2022 г. – 160 тыс. т. При сохранении аналогичных темпов к 2030 г. этот показатель может достигнуть 200 тыс. т (рисунок 1.2.1). До 2017 г. около 80 % всех антибиотиков, используемых в России, применялись в животноводстве [65].

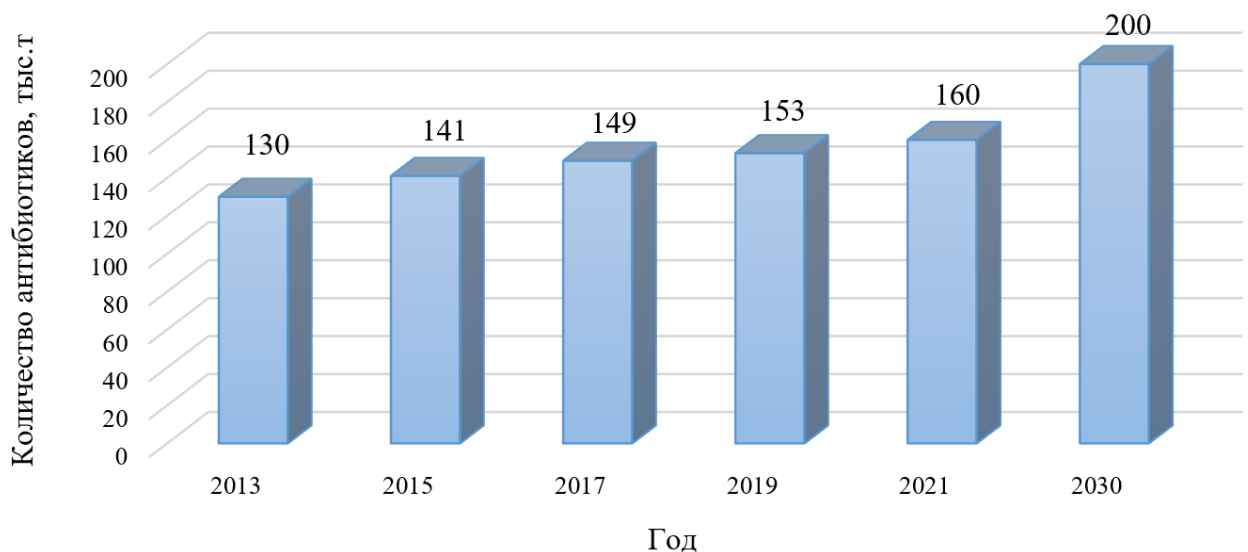


Рисунок 1.2.1 – Динамика использования антибиотиков в мировом животноводстве [66]

Антибиотики амфениколы широко используются в ветеринарии в лечебных и профилактических целях [35, 129]. Например, для стимулирования роста организма животных и повышения эффективности кормов на их организм, которые являются сырьем для производства пищевых продуктов [51, 235].

Чрезмерное использование антибиотиков (нетерапевтическое) и их присутствие в продуктах животного происхождения представляет собой проблему для общественного здравоохранения в связи с развитием устойчивости у целевых патогенных штаммов, индукцией аллергических реакций у некоторых гиперчувствительных людей и потенциальным нарушением работы кишечника и иммунной системы человека [25, 96, 145].

Согласно научной литературе около 70 % антибиотиков амфениколов применяется в сельском хозяйстве, а в медицине только около 20 % [72, 89, 175]. Среднее годовое потребление амфениколов для свиней оценивается в 45 мг/кг, для кур – 148 мг/кг, для крупного рогатого скота – 172 мг/кг [136, 233]. По данным официальной статистики ЕС, пропорции антибиотиков, применяемых в медицине и животноводстве, различаются в разных странах.

Широкое использование хлорамфеникола в области ветеринарии привело к появлению важной проблемы – это содержание остаточных компонентов данного антибиотика в продуктах питания животного происхождения (мясо, молоко, мед, рыбопродукты и пр.), что оказывает токсическое действие на организм потребителя [65, 72, 257]. В связи с этим на территории США с 1984 г. и на территории некоторых стран ЕС (с 1994 г.) использование хлорамфеникола запрещено для лечения сельскохозяйственных животных и птицы [87, 96, 250].

В России использование этого антибиотика в сельском хозяйстве разрешено при условии, что его концентрация и концентрация продуктов распада не превысят нормативные показатели, указанные в Техническом регламенте Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [118] и в Техническом регламенте Таможенного союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [117]. В то же время существует проблема незаконного использования этого антибиотика, что приводит к появлению его остаточного количества в продуктах животного происхождения: мясе, молоке и продуктах их переработки, рыбопродуктах и продуктах пчелопродукции [131, 197, 259]. На сегодняшний день во всех странах ЕС и Таможенного Союза установлен

максимально допустимый уровень содержания хлорамфеникола в продуктах животного происхождения на уровне 0,0003 мкг/см³ [118, 264].

Амфениколы, включая хлорамфеникол, флуорфеникол и флуорфеникол амин, являются легкодоступными антибиотиками широкого спектра действия [183]. Амфениколы с момента их открытия в 1950-х гг. сыграли решающую роль в обеспечении экономической эффективности животноводства в качестве кормовых добавок в субтерапевтических дозах для улучшения роста сельскохозяйственных животных и эффективности преобразования корма, а также для предотвращения инфекций [184, 206, 216]. Они эффективны против широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая большинство анаэробных организмов [260, 273].

В качестве возможных объяснений того, как субтерапевтические уровни антибиотиков группы амфениколы улучшают рост поголовья скота, было предложено несколько механизмов. В работе [159] представлена гипотеза о том, что введение субтерапевтических уровней антибиотиков позволяет животным снизить энергию, необходимую для поддержания комменсальных бактерий желудочно-кишечного тракта, тем самым повышая общую энергию, необходимую роста организма. Данное утверждение подтверждено рядом экспериментов. Доказано, что цыплята, выращенные в изолированных условиях, т. е. не имеющие комменсальных бактерий, не испытывали усиленного роста при кормлении антибиотиками [152, 246]. Однако наличие комменсальных бактерий необходимо для поддержания важных физиологических и иммунологических функции, для пищеварения и т. д., т. е. для поддержания здорового состояния организма-хозяина [155, 157, 177]. Кишечные бактерии, конкурируя за колонизацию, помогают получить повышенную защиту от патогенных бактерий [161]. Бактерии – представители ЖКТ – поглощают питательные вещества, выделяя метаболиты, не способные синтезироваться в организме-хозяина, увеличивают оборот эпителия кишечника и снижают усвояемость жира [176]. Это может привести к чрезмерному росту бактерий в тонком кишечнике, что связано с

нарушением всасывания, потерей веса и ухудшением общего состояния животных, что может повлиять на их рост и развитие [206, 240, 256].

Доказано, что амфениколы подавляют рост патогенных бактерий даже на субтерапевтическом уровне во время фазы роста животных, что улучшает их общее состояние здоровья и стимулирует увеличение веса [157, 160]. Данная активность амфениколов возможна благодаря их способности снижать количество метаболитов, подавляющих рост организма (продуктов распада желчи), за счет изменения уровня ферментов, преобразующих желчные кислоты (активности холилтауриновой гидролазы в кишечнике), что приводит к увеличению веса у животных [161, 204, 206].

Доказано, что антибиотики группы амфениколы способны улучшать барьерную функцию кишечника организма-хозяина, утрамбовывая стенки воспаления и стимулируя усвоение питательных веществ [236]. Версия о том, что антибиотики оказывают противовоспалительное действие на воспалительные клетки, подтверждает эту теорию [147, 273].

Несмотря на современное развитие науки и техники, до сих пор не установлен точный механизм действия антибиотиков – стимуляторов роста животных [224, 229, 233]. В научной литературе имеется две версии действия данных веществ: влияние на качественный и количественный состав микробиоты кишечника и влияние на физиологические процессы у скота.

1.3 Влияние антибиотиков группы амфениколы на биобезопасность молока и молочной продукции

Молоко и молочные продукты представляют собой продукты питания, имеющие большое питательное, социальное и экономическое значение, которые производятся во всем мире с использованием самых разных производственных систем и технологий [5, 8, 21, 22, 124]. Потребление молока широкомасштабно во всем мире и оценивается в 600 млн т на конец 2022 г. [65].

В России молочные продукты являются одними из самых востребованных и популярных товаров у населения [15]. Они используются в ежедневном рационе питания, а также рекомендованы врачами для различных диет в качестве геродиетических продуктов питания и в качестве продуктов детского питания. Как следствие, безопасность молока представляет собой важную проблему [28, 67, 133].

Одним из основных показателей качества и биобезопасности молочных продуктов является отсутствие антибиотиков в исходном сырье – молоке [13, 77, 116, 180]. Наличие даже мельчайших частиц антибиотиков в его составе оказывает негативное влияние не только на качество готовой продукции, но и на иммунную систему и здоровье человека [60, 62, 68, 69].

Основная причина использования антибактериальных препаратов у молочного скота – это проблема заболевания маститом у животных. Проведенный аналитический обзор литературных данных позволил установить, что антибиотики группы амфениколы наиболее часто используются для предотвращения данного заболевания у молочного скота [29]. Следовательно, существует достаточно высокая степень попадания антибиотика в продукты животноводства, а именно в молоко [19, 55, 58].

По данным Роспотребнадзора, основными продуктами питания, которые подвержены загрязнению остатками антибиотиков группы амфениколы, являются молоко и молочная продукция (рисунок 1.3.1).

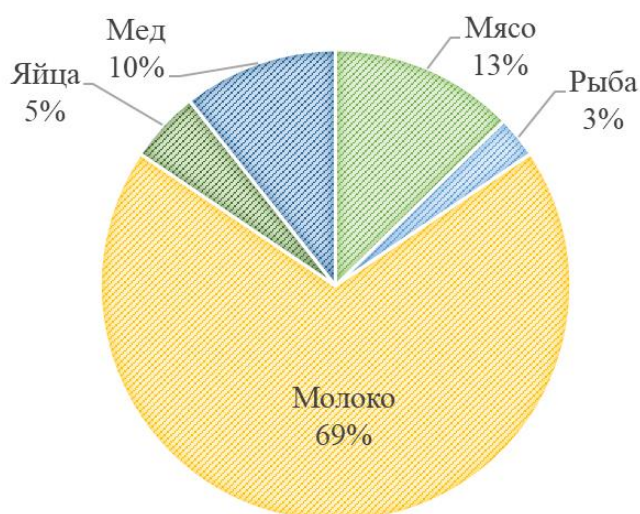


Рисунок 1.3.1 – Содержание антибиотиков в различных группах продуктов питания [217]

С каждым годом проблема загрязнения молока остаточными количествами рассматриваемой группы антибиотиков становится более острой и приобретает все большее значение [63, 103]. Последствия попадания антибиотиков в организм человека опасны сами по себе, а при регулярном употреблении продуктов, содержащих антибиотики, у человека развивается устойчивость и иммунитет к лекарствам и продуктам на основе антибиотиков [105, 108, 122].

Общенациональные исследования показали, что хлорамфеникол был основным антибиотиком группы амфениколы, обнаруженным в сыром молоке [162]. По результатам исследований, проводимых в период с 2017 по 2022 гг., в ходе которых проанализировано 7201,0 образца молока и продуктов его переработки, 377,0 проб (что составляет 5,2 % от общего числа проб) оказались положительными, т. е. в них обнаружено наличие антибиотиков исследуемой группы [217, 244].

Основные нормативные требования по качеству и биобезопасности молока и молочной продукции, устанавливающие правила их соответствия требованиям законодательства Российской Федерации, форму оценки и утверждения, отражены в Технических регламентах Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [117] и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [87, 118].

По действующим в России нормативам молоко, содержащее антибиотики группы амфениколы, подлежит утилизации, что приводит к убыткам предприятий. Тем не менее некоторые партии зараженного антибиотиками молока попадают в переработку, что делает продукт опасным [67, 101]. Ответственность за нарушение безопасности продукции несет переработчик, именно молокоперерабатывающее предприятие отвечает за качество и безопасность конечного продукта [80, 82, 108]. На предприятие-нарушителя налагаются крупные штрафы, продукция изымается из оборота, предприятие терпит убытки и теряет доверие потребителей [104, 107, 134].

В ходе ряда экспериментов было установлено, как антибиотические препараты и их остаточные следы попадают из сырого молока в продукцию на его основе [64, 66]. Для этого в молоко, в котором отсутствуют лекарственные вещества, добавляли определенное количество антибиотиков, затем «зараженное» молоко

подвергали необходимым технологическим операциям (обработке) и анализировали на содержание антибиотика, оценивая таким образом влияние различных способов переработки «зараженного» молока на содержание антибиотика в готовом продукте [79, 97, 153, 201]. Установлено, что от характеристик производственного процесса и процессов обработки сырья зависит попадание антибиотика из «зараженного» сырья (молока) в готовый продукт [85, 92, 258].

К популярным у потребителей продуктам на основе молока относят йогурт, сыр, сметану, ряженку и прочие кисломолочные продукты [14]. Несмотря на различные технологические процессы, используемые для получения данных кисломолочных продуктов, имеется общий процесс – пастеризация молока [18, 20]. При температурной обработке молока происходит разложение всех остатков антибиотиков [205, 218]. Однако значения, приведенные в научной литературе, показали, что несмотря на пастеризацию в готовом продукте присутствуют следы ряда антибиотических препаратов. Разложение антибиотиков зависит от его типа, матрицы продукта, применяемой температуры и времени пастеризации. В исследовании [146] показано, что амфениколы подвержены большему термическому разложению в воде-матрицы, чем в молоке-матрицы. В других исследованиях представлены противоречивые данные о том, что разложение амфениколов не зависит от типа матрицы продукта [87, 153, 154].

В результате нет однозначного ответа на то, как температура и время пастеризации влияют на содержание антибиотиков в готовом продукте [26, 39]. Однако неоспоримым является тот факт, что эти основные параметры пастеризации влияют на скорость деградации антибиотиков (в том числе и амфениколов), и что степень разложения зависит от исходной концентрации антибиотика. Следовательно, имеется предположение о том, что различные типы пастеризации незначительно снижают концентрацию антибиотиков в готовом продукте [148]. Из этой гипотезы следует, что в кисломолочных продуктах, приготовленных на основе «зараженного» молока, содержится равная или меньшая концентрация антибиотика, содержащаяся в сырье [87, 169, 170].

В исследовании А. Gajda показано что из-за наличия липофильности антибиотиков группы амфениколы способны распределяться между фракциями молока [258]. Было оценено, как представители данной группы распределяются между жировой фракцией и фракциями обезжиренного коровьего молока. Установлено, что хлорамфеникол сохраняет свою концентрацию (изначально находившуюся в сырье) в продуктах с высоким содержанием жира (масле и сметане), а в продуктах с меньшим содержанием жира – твороженном сыре и сыворотке – присутствует в более низких концентрациях в сравнении с сырьем [151, 158].

Так как для производства широкого спектра кисломолочных продуктов используются различные технологические процессы (отличающиеся по происхождению молока, типам его обработки и т. д.), то ряд исследователей изучил то, как происходит распределение антибактериальных препаратов между сывороткой и белковой фракцией после их введения в коровье, овечье и козье молоко [200, 205, 214, 218, 259, 264, 265]. Ряд исследований доказывает, что от растворимости антибиотика в воде и его способности взаимодействовать с жировой и/или белковой фракцией зависит удержание антибиотика в продукте [24, 87].

В исследованиях [186, 198] описываются основные изменения, которые происходят с амфениколами в процессе созревания сыров. Было доказано, что в исследуемых образцах сыра «Трончон» по истечении тридцатидневного созревания антибиотиков хлорамфеникол и флорфеникол амин не были обнаружены. Концентрация рассматриваемой группы антибиотиков в сыре снижается в результате длительного созревания, при котором происходит распад молекул антибиотиков. Процесс распада молекул антибиотиков зависит от условий созревания продукта, которые варьируются в зависимости от типа сыра [169, 171].

Важным аспектом в изучении влияния антибиотика на готовый продукт является оценка их воздействия на микробиоту молочных продуктов [32–34]. В 1948 г. ученый Р. Kastli в своих исследованиях показал, что обработка вымени коров хлорамфениколом (левометицином) влияет на производство молочных продуктов. Это объясняется тем, что остаточные антибиотики в концентрации 0,1–1 МЕ (международная единица), которые попадают в сырое молоко из вымени, подавляют

рост стартовых культур [191]. Это заявление привело к проведению ряда исследований, направленных на определение влияния антибиотиков на активность молочных культур и качество молочных продуктов. Данные работы привели к широкой дискуссии в научном и профессиональном сообществах, которая продолжается и на сегодняшний день, о чем свидетельствует ряд противоречивых данных, отраженных в научных работах [104, 193].

Остатки амфениколов в молоке, используемом для производства кисломолочных продуктов, имеют негативные экономические последствия для молочной промышленности, поскольку влияют на технические процессы и снижают качество конечного продукта [30, 36]. Был выявлен ряд проблем, вызванных наличием антибиотиков в исходном сырье: подавление процессов жизнедеятельности заквасочных культур, свертываемость молока, образование «деградированных» белковых сгустков и изменение органолептических показателей конечного продукта [19, 267].

Из-за широкого спектра различных видов штаммов, используемых в производстве кисломолочной продукции, в научной литературе представлены данные, которые разнятся по чувствительности молочных культур к антимикробным препаратам [89, 122, 229]. Однако выделяют следующие факторы, влияющие на чувствительность молочнокислых заквасочных бактерий: тип заквасочной культуры, ее состав (монокультура или смешанная культура), тип противомикробного препарата (механизм действия антибиотика на микробную клетку) и т. д. [87, 192].

Остатки антибиотиков группы амфениколы частично или полностью подавляют развитие молочнокислых заквасочных бактерий. Следовательно, снижают выработку молочной кислоты данными бактериями. Снижение количества молочной кислоты в продукте, следовательно, рН продукта негативно сказывается на технологических процессах производства, особенно в сыроварении, т. к. наличие молочной кислоты влияет на активность ферментов и скорость коагуляции белков [87, 148].

В работе [154] была изучена чувствительность к различным концентрациям антибиотика группы амфениколов для различных заквасочных культур, используемых в производстве сыра и йогурта. Ученые обнаружили, что заквасочные культуры проявляют различную чувствительность в зависимости от типа и

количества антибиотика. В исследовании P. Navrátilova проанализирована чувствительность молочнокислых бактерий, выделенных из йогурта, к антибиотикам хлорамфениколу и флорфениколу [191]. Результаты показали, что низкие концентрации промикробных препаратов, содержащихся в молоке, ингибировали рост и активность молочнокислых культур.

Учеными установлено, что бактерии, используемые в качестве заквасок для производства сыров, проявляют большую устойчивость к действию хлорамфеникола, чем бактерии, используемые в производстве йогуртов. Несмотря на наличие устойчивости заквасок сыра к антибиотикам, изменения в готовой продукции присутствуют [156, 158, 245]. В работе [246] показано, что добавление хлорамфеникола в молоко для производства сыра чеддер вызывало задержку выработки молочной кислоты и недопустимые органолептические характеристики, такие как пастообразная консистенция и ферментированный или дрожжевой аромат в готовом продукте [87, 249, 255].

Наличие антибиотиков в молоке-сырье, помимо негативного влияния на технологические процессы, следовательно, на получение кисломолочных продуктов плохого качества, влияет на появление антибиотикорезистентных бактерий у людей, потребляющих данные продукты [176, 187, 222]. В популяции бактерий, подвергшейся воздействию антибиотиков, у некоторых бактерий в результате передачи генов устойчивости развивается устойчивость к действию данных лекарственных препаратов (рисунок 1.3.2) [225, 261]. Таким образом, присутствие остаточного количества антибиотиков по всей пищевой цепи может вызывать развитие переносимой антибиотикорезистентности не только у патогенов, но и у комменсальных бактерий, включая молочнокислые бактерии желудочно-кишечного тракта организма-хозяина, употребившего «зараженный» антибиотиками продукт [87].

Были проанализированы экспериментальные исследования и обзоры, описывающие профили устойчивости молочнокислых бактерий, в которых было установлено наличие в геноме элементов переноса (плазмид, транспозонов, интегринов) и инсерционных последовательностей, вызывающих внутри- и межвидовой перенос генетического материала [76, 89, 170]. Подобные последовательности были

идентифицированы у молочнокислых бактерий, выделенных из сыра [205]. В исследованиях сообщалось об обнаружении устойчивости к антибиотикам факторов вирулентности у молочнокислых бактерий из таких продуктов питания, как йогурт и творог [146, 235]. Пробиотический потенциал многих из этих бактерий поддерживает идею о том, что они могут поселиться в кишечнике человека и передать устойчивость к антибиотикам микробиоте кишечника [87].

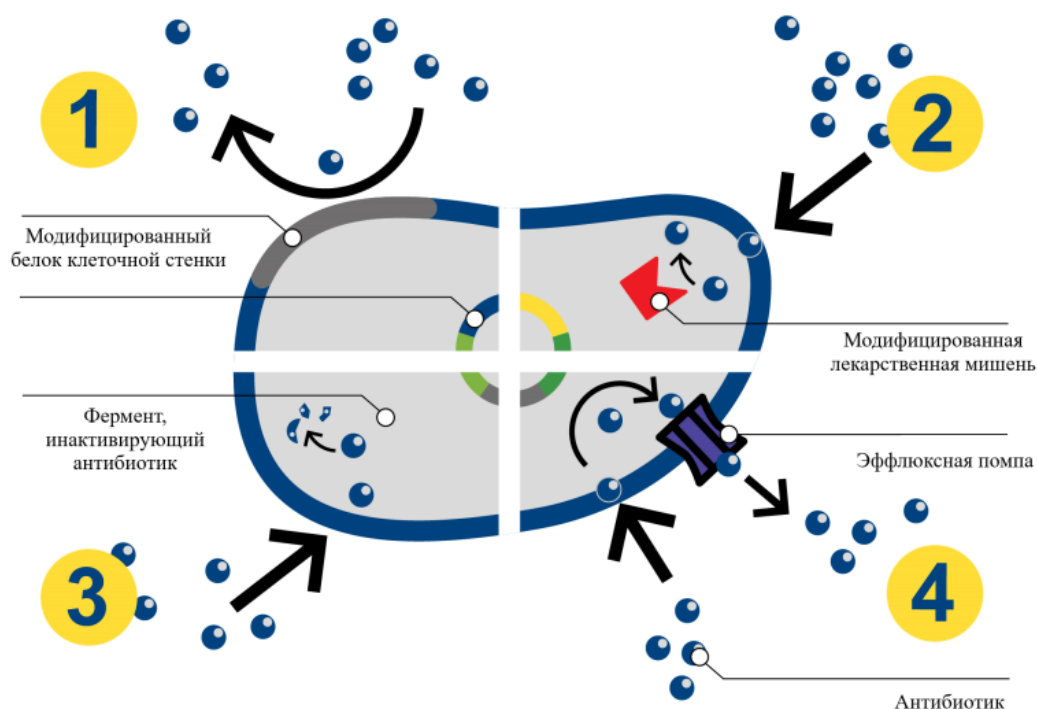


Рисунок 1.3.2 – Механизм антибиотикорезистентности:

- 1 – клеточная мембрана образует непроницаемый барьер, блокирующий антибиотики;
- 2 – модификация компонентов бактерий;
- 3 – выработка клеткой ферментов, инактивирующих антибиотики;
- 4 – процесс активного «выкачивания» антибиотика из бактерий [274]

Было установлено, что остатки антибиотиков в молоке и молочных продуктах связаны с развитием устойчивых бактерий в этих продуктах. Например, в исследовании К. Brown установлено, что в образцах молока с остатками антибиотиков были обнаружены штаммы *Escherichia coli* [146]. Приблизительно 92,8 % были устойчивы к ампициллину, 50,0 % к левометицину. Аналогично, Е. L. Zubei и Е. О. Owni обнаружили, что 20,0 % проверенных образцов молока были загрязнены

антибиотиками и что бактерии, выделенные из проверенных образцов, показали широкий спектр множественной устойчивости [87, 197].

Проведенный литературный обзор показал, что наличие антибиотика и их остаточных следов в молоке как сырье для изготовления кисломолочных продуктов приводит к следующим негативным последствиям:

1. Получению готовой продукции, качество которой не соответствует ГОСТ (органолептические показатели несвойственные тому или иному виду продукции и т. п.);

2. Появлению резистентных бактерий в молоке и молочных продуктах, что негативно сказывается на качестве готовой продукции;

3. Появлению резистентных бактерий у потребителя данной продукции.

Следовательно, наличие антибиотиков в молоке является актуальной проблемой. Помимо нарушаемых запретов на использование антибиотиков в животноводстве, необходимы новые, различные способы усовершенствования и обнаружения данных веществ в сырье и готовой продукции, а также методы их извлечения [87].

1.4 Методы определения амфениколов в молоке и молочной продукции

Проведенный обзор литературы (с 2018 по 2022 гг.) показал, что антибиотик хлорамфеникол, относящийся к группе антибактериальных препаратов амфениколы, широко используется в сельском хозяйстве (примерно в 64 % от всех проанализированных исследований). Также из обзора литературы видно, что наиболее часто анализируемой пищевой матрицей для определения антибиотиков является молоко и молочные продукты, за которыми следуют мясо и мясные продукты, морепродукты и продукты пчелопродукта [128, 139, 142].

Основные методы, используемые для определения антибиотиков в молоке и продуктах молочного происхождения, можно разделить на две основные группы: скрининговые методы и методы количественного определения [71, 111–114, 129].

К первой группе – методы скрининга – относят, например, использование биосенсоров, которые в последнее время являются перспективными и востребованными при анализе молока и молочной продукции. Биосенсоры представляют собой устройства, в которых используется ряд биологических элементов (ферментов, антител, аптамер) и/или биохимические реакции для обнаружения конкретных химических аналитов посредством количественной оценки оптических, тепловых, электрических или пьезоэлектрических сигналов, что позволяет обнаружить конкретные соединения в сложных матрицах [129, 137, 144]. Один из популярных и эффективных типов биосенсоров – это биосенсоры на основе аптамеров или аптасенсоры [143]. Аптасенсоры представляют собой сенсорные платформы для мониторинга антибиотиков, в частности амфениколов, в продуктах животного происхождения (в том числе молоке и молочной продукции). Существующие аптасенсоры для амфениколов подразделяются на следующие категории: оптические и электрохимические [129, 228, 238].

Оптические аптасенсоры обладают высокой чувствительностью, селективностью и быстрым реагированием без необходимости в сложных аналитических инструментах [129, 162, 266]. Для изготовления оптических аптасенсоров используют следующие технические методы: колориметрический, флуоресцентный, хемилюминесцентный и иммуноферментный анализ [237, 271]. Наиболее востребованными являются:

1. Колориметрические аптасенсоры. Они считаются одними из самых простых подходов к зондированию, которые используют свойство агрегации, индуцированной солью, наночастиц золота. Обладает потенциалом для анализа «невооруженным глазом». Так как колориметрическим аптасенсорам не требуются интеркалирующие красители и флуоресцентные метки, то они подходят для обнаружения «на месте» [129, 139, 140].

2. Флуоресцентные аптасенсоры. С использованием квантовых точек и наночастиц флуоресцентные аптасенсоры эффективны для создания аптасенсоров с максимальной способностью обнаружения амфениколов вплоть до уровня пикомолей [129, 248].

3. Электрохимические аптасенсоры способны с высокой чувствительностью количественно определять хлорамфеникол. Среди электрохимических аптасенсоров выделяют вольтамперометрические и электрохемилюминесцентные датчики, которые способны на уровне фемтомолей определять значения хлорамфеникола [129, 195, 247].

Для создания сверхчувствительных аптасенсоров для обнаружения хлорамфеникола вольтамперометрия и методы электрохемилюминесценции проявляют большой потенциал. Разработанные на электрохимической основе аптасенсоры обладают более низким пределом обнаружения и более высокой способностью обнаруживать хлорамфеникол по сравнению с оптическими [129, 138, 163].

Известны случаи комбинирования аптасенсоров с другими методами анализа. В работе Y. Duana представлена методика идентификации хлорамфеникола в молоке с помощью специфичного аптамера и флуоресцентной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR). 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 специфически связывается с ними, образуя структуру шпильки, 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 представленная методика Y. Duana обладает высокой чувствительностью и селективностью в отношении структурных аналогов хлорамфеникола (таких как флорфениколы), а также позволяет определить хлорамфениколы от 0,1 до 20,0 нг/мл [129].

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 позволял

определить концентрацию хлорамфеникола в диапазоне от 0,16 до 161,56 мкг/л с пределом обнаружения 0,013 мкг/л [143].

Несмотря на уникальные преимущества аптасенсоров на оптической и электрохимической основе, недостатком данного скрининг-метода является их длительное изготовление и доступность. Данные недостатки отсутствуют у второй группы методов определения антибиотиков – количественных методов.

1.4.1 Хроматографическое определение амфениколов

Подтверждающие методы – это методы, основанные на количественном определении антибиотиков в различных матрицах (молоке и других продуктах животного происхождения), которые состоят из двух основных этапов: подготовки образцов с последующим разделением и обнаружения антибиотиков в подготовленных пробах.

Подготовка проб – первый и важный этап любого аналитического процесса, т. к. перед началом анализа необходимо и важно правильно извлечь и сконцентрировать анализируемые вещества, а также удалить как можно больше мешающих соединений [128, 184, 243]. Следовательно, для эффективного обнаружения антибиотиков необходимы исследования, связанные с постановкой метода на прибор, оптимизацией детекторов и разработкой новых способов очистки и выделения целевого компонента на этапе пробоподготовки.

Последние тенденции в аналитической химии направлены на упрощение процедур подготовки проб и минимизацию использования органических растворителей [164, 200, 204]. Во время подготовки образца целевые аналиты необходимо извлечь из большого количества других компонентов сложных пищевых матриц. Этапы очистки и концентрирования также важны, т. к. необходимы для устранения помех в тех случаях, когда аналит слишком разбавлен в экстракте. Иногда экстракцию и очистку можно выполнить только за один этап в зависимости от

используемой методики подготовки образца. Потери аналита на этом этапе могут поставить под угрозу результат анализа [54, 98, 129]. Таким образом, подготовка проб – важный этап аналитического процесса. Наиболее широко используемые подходы – это жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) и/или твердофазная экстракция (ТФЭ). Однако миниатюрные подходы становятся популярными, поскольку безопасны для окружающей среды [27, 184, 204].

Для обнаружения амфениколов используется жидкостно-жидкостная экстракция отдельно или с последующей ТФЭ. Этилацетат является наиболее часто используемым растворителем для экстракции амфениколов по отдельности или в виде смеси [129, 142]. Он также может быть связан с муравьиной кислотой или раствором фосфата. Если требуется обезжиривание, то используется гексан или изооктан, который может быть добавлен к этилацетату. В смесь также можно добавить хлороформ, чтобы помочь удалить лишнюю воду из экстракта. Также используются другие смеси экстрагирующих растворителей, такие как ацетонитрил и гексан, ацетонитрил и хлороформ, ацетонитрил и гексан [268, 275]. В своей работе I. A. Khan использовал водные двухфазные системы на основе имидазолиевой ионной жидкости тетрафторбората 1-бутил-3-метилимидазолия ($[Bmim]BF_4$) для экстракции хлорамфеникола молока [254]. В результате были достигнуты хорошие степени извлечения хлорамфеникола из молока путем оптимизации типа и количества солей, значения pH, объема $[Bmim]BF_4$ и температуры экстракции.

Твердофазная экстракция широко используется в качестве метода подготовки проб для анализа амфеникола в пищевых продуктах. Простая ТФЭ использовалась путем смешивания образца с сорбентом или путем прямого нанесения жидких образцов на сорбент. Октадецилсилан (C18) и Oasis HLB (поли(дивинилбензин-со-N-винилпирролидон)сополимер) являются наиболее часто используемыми сорбентами ТФЭ. Оба сорбента могут обеспечить удовлетворительное извлечение. EXtrelut® NT также использовался для извлечения хлорамфеникола из молока [109].

Для улучшения извлечения и селективности использовались альтернативные сорбирующие материалы, особенно для отдельных амфениколов. В работе

С. Yan с коллегами описано использование многостенных углеродных нанотрубок в качестве сорбента для определения хлорамфеникола в молоке с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [162]. Данные углеродные трубки привлекли внимание благодаря высокой удельной площади и гидрофобным характеристикам его поверхности, которые улучшают извлечение (95,8–102,3 %). Они также успешно использовались в качестве сорбента [148]. Многостенные углеродные нанотрубки представляют собой синтетические полимеры с высокой степенью сшивки, разработанные для обеспечения улучшенной селективности по отношению к определенной структуре или очень близкой структуре. Благодаря своим характеристикам МИП могут выборочно извлекать амфениколы из различных матриц. Комбинация ЖЖЭ и ТФЭ также является обычной процедурой при анализе амфениколов для хлорамфеникола в молоке [149].

Миниатюрные подходы также использовались для экстракции и очистки амфениколов в молоке и молочных продуктах. Эти методы позволяют минимизировать размер образца и объемы растворителей, что делает их экологически безопасными [208, 209, 252]. М. Rezae с коллегами описал использование процедуры монолитной капиллярной микроэкстракции для экстракции хлорамфеникола из меда, молока и яиц [246]. Устройство состояло из головки булавки для экстракции, цилиндра шприца и замены металлической иглы на головке булавки на монолитную капиллярную колонку из поли. Было получено улучшенное извлечение по сравнению с традиционными подходами. Дисперсная жидкостно-жидкостная микроэкстракция применялась при анализе хлорамфеникола в образцах молока. Основными преимуществами метода были высокий коэффициент обогащения и высокий уровень извлечения, а также уменьшение объема экстракционного растворителя до уровня в мкл. В работе зарубежных ученых [153] также использовали полимер с молекулярным отпечатком для анализа флорфеникола в молоке и меде, но методом пробоподготовки была твердофазная микроэкстракция. Повышение извлечения достигнуто на 92,9–99,3 %.

В работе [243] использовали процедуру QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) для проведения экстракции хлорамфеникола из молока и молочных продуктов. В результате ученым удалось получить хорошее извлечение хлорамфеникола – 97,8–102,8 %. По словам авторов, главное преимущество QuEChERS заключается в том, что он позволяет производить экстракцию и очистку для всех матриц без дополнительной очистки экстрактов.

Газовая хроматография (ГХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) являются широко используемыми аналитическими методами для анализа антибиотиков в пищевых продуктах. ГХ используется для анализа хлорамфеникола в различных пищевых продуктах, таких как морепродукты, ткани животных, мед и молоко, а также для анализа смеси трех амфениколов и смеси трех амфениколов плюс флорфеникол амин [167, 211, 234].

Поскольку амфениколы являются полярными, нелетучими и термолабильными молекулами, перед ГХ-анализом они должны быть преобразованы в стабильные летучие соединения. Наиболее широко используемыми реагентами для дериватизации были N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA) и триметилхлорсилан (TMCS), гексаметилдисилазан (HMDS) и триметилхлорсилан (TMCS) и пиридин [158, 166]. По словам исследователей [263], чувствительность дериватизированных продуктов BSTFA возрастала с увеличением времени реакции. Однако для достижения максимума требовалось почти 240 мин. Когда к BSTFA добавляли 1 % TMCS, то реакция дериватизации завершалась за 40 мин с высокой чувствительностью. Следовательно, дериватизацию лучше проводить при 70 °C в течение 40 мин с использованием BSTFA + TMCS (99:1) в качестве дериватирующего агента. Следует подчеркнуть, что дериватизация является дополнительным этапом подготовки образца и может увеличить время анализа, что может повлиять на воспроизводимость на следовых уровнях [190].

Фенилметилсилоксан (5 %) был наиболее часто используемой неподвижной фазой в колонках, длина которых варьировалась от 30 до 125 мм, внутренний диаметр 0,20–0,32 мм, размер частиц 0,25–0,50 мкм. Чувствительность методов была адекватной для анализа амфениколов с использованием как MS, так и детектора

электронного захвата (ЕС), достигая пределов количественного определения 0,0012–0,0014 (хлорамфеникол) и 0,0014 мкг/кг (флорфеникол и флорфеникол амин в яйцах и меде, в мышцах и печени птицы, свиньи) [185, 220].

В работе [174] показано, что хлорамфеникол в молоке, используя 100 % диметилполисилоксан (300×0,25 мм, внутренний диаметр 0,25 мкм) и tandemный масс-спектрометрический детектор (MS / MS), можно найти значения для предела принятия решения ($CC\alpha$) и способности обнаружения ($CC\beta$) – 0,083 и 0,14 мкг/кг соответственно. Авторы сравнили эффективность этого метода с процедурой ЖХ-МС/МС и наблюдали аналогичную чувствительность, но последняя обеспечила лучшие параметры валидации (восстановление, повторяемость и неопределенность) и потребовала меньше времени. На основании этих результатов можно анализировать хлорамфеникол по отдельности или все амфениколы и метаболит флорфеникол амин одновременно с помощью ГХ или жидкостной хроматографии и получить надежные результаты.

По результатам литературного обзора, проведенного с 2018 по 2022 гг., установлено, что наиболее востребованным и эффективным количественным методом оценки антибиотиков в продукции животноводства является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [231]. Востребованность данного метода для определения остаточного количества амфениколов в молоке и продуктах его переработки объясняется возможностью одновременного анализа сразу нескольких остатков в образце за относительно короткое время [223]. Именно метод ВЭЖХ получил наиболее широкое применение в аналитических лабораториях по контролю за качеством в пищевом производстве [128, 262, 270].

В работе L. R. Guidia описывается метод твердофазной магнитной экстракции (MSPE) в сочетании с методикой ВЭЖХ с диодной матрицей (HPLC-DAD) для количественного определения хлорамфеникола в образцах молочной продукции [142]. Магнитные наночастицы, покрытые нановолокном с использованием полевой эмиссионной сканирующей электронной микроскопии (FE-SEM), рамановской спектроскопии и анализа порошковой рентгеновской дифракции (XRD), были использованы в качестве твердофазного сорбента. Полученные в результате

исследований параметры рассматриваемого метода для анализа хлорамфеникола были систематически исследованы и оптимизированы. После проведенной экстракции линейный диапазон для исследуемого вещества ($R^2 > 0,9954$) был получен в диапазоне 10,0–600,0 нг/мл. Для хлорамфеникола предел обнаружения составил 3,02 нг/мл. Разработанный метод, основанный на твердофазной магнитной экстракции в сочетании с методикой ВЭЖХ с диодной матрицей, был применен к образцам молока для количественного определения остатков хлорамфеникола. При использовании модельного раствора с добавками значения восстановления были найдены в диапазоне 94,6–105,4 % ($n = 3$) [128].

В работе Y. Xie рассматривался быстрый, простой и эффективный метод одновременного определения трех общих остатков антибиотиков, включая хлорамфеникол в сыром молоке [251]. Метод молекулярного импринтинга в сочетании с ТФЭ был использован для предварительной обработки тестовых образцов и 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.

В работе E. Paryga 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 и флорфеникола [239]. Аналиты извлекали этилацетатом, затем его испаряли, остаток повторно суспендировали в воде высокой степени очистки, обезжиривали n-гексаном, а ТФЭ проводили с помощью картриджей BondELUT C18. Сепарацию проводили на фенильной колонке С6 с подвижной фазой, состоящей из 0,1 % муравьиной кислоты в воде высокой степени очистки и ацетонитриле. Отклик детектора был линейным в диапазоне испытанные концентрации 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 [128].

В работах В. Г. Амелина рассматривался простой способ подготовки образцов и определения антибиотиков амфениколов в пищевых матрицах животного происхождения методом хроматографии-квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии [2, 3]. 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 [128].

Простой, дешевый и быстрый метод определения хлорамфеникола представлен в работе Т. Śniegocki и др. с использованием метода QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) [128, 243]. Для качественного подтверждения и количественной оценки остатков хлорамфеникола использовалась система ВЭЖХ-МС/МС. Лучшее разделение (симметричная форма пика и минимальный матричный эффект) и более длительное время удерживания антибиотика были оценены с использованием 0,5 % изопропанола в 0,1 % уксусной кислоте в воде:метаноле. Извлечение находилось в диапазоне от 93,1 % до 108,0 % при повторяемости менее 9,2 % и внутрилабораторной воспроизводимости менее 13,1 % [128].

В исследовании М. Britzi и F. Schwartsburd описывается определение хлорамфеникола в коровьем и овечьем молоке с использованием жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектроскопией [167, 168]. Метод позволяет обнаруживать и количественно определять антибиотик при максимальных пределах его 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 варьировались от 3 до 16 %.

Группой ученых из Китая был разработан метод, основанный на сверхэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии в сочетании с твердофазной экстракцией для определения запрещенных ветеринарных препаратов [154]. Основные факторы, влияющие на отклик, извлечение и чувствительность метода, такие как тип и значения pH 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 (pH 9,0) и экстрагировали ацетонитрилом. Экстракт дополнительно экстрагировали этилацетатом. После центрифугирования супернатант этилацетат концентрировали почти досуха в азоте при температуре ниже 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 мм × 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 электро-распылением. Для количественного анализа использовали метод изотопного внутреннего стандарта. В оптимальных условиях каждый аналит показал хорошую линейную зависимость в каждом диапазоне, а коэффициент корреляции (1 % водный раствор муравьиной кислоты в качестве подвижных фаз) (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 [128].

На основании проведенного литературного анализа установлено, что метод ВЭЖХ широко используется для анализа хлорамфеникола в пищевых матрицах –

молоке и молочной продукции. Это избирательная и эффективная система для обнаружения остаточной концентрации амфениколов. Несмотря на все положительные качества рассмотренных методов, недостатками на сегодняшний день остаются ограниченная доступность аналитического оборудования (хроматографов) в лабораториях из-за высокой стоимости и нехватка специализированного персонала для его эксплуатации.

1.5 Обоснование основных направлений исследований, их цель и задачи

Анализ научных публикаций по исследуемой теме показал, что на сегодняшний день биобезопасность молока является одной из глобальных и основных проблем в области сельского хозяйства и здравоохранения. Так как присутствие антибиотика (из-за крупномасштабного применения этих лекарственных препаратов в животноводстве для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а также в качестве стимуляторов роста животных) в исходном молоке и кисломолочных продуктах на их основе создает целый ряд серьезных проблем: порча готовой продукции, экономический ущерб предприятию и глобальная угроза здоровью потребителя из-за возникновения антибиотикорезистентности. Следовательно, определение амфениколов и их остаточных следов в молоке и молочной продукции является актуальной задачей.

Во многих работах разрабатываются подходы к одновременному определению амфениколов совместно с другими антибиотиками и лекарственными препаратами. Появились работы по определению амфениколов с помощью различных биосенсоров, характеризующиеся высокой чувствительностью и специфичностью, быстротой проведения анализа и возможностью одновременного анализа большого количества образцов. Анализ данных также показал, что за последние пять лет в качестве основного аналитического метода для определения антибиотиков группы амфениколов и продуктов его распада используют хроматографические методы.

Наиболее перспективными в области проведения научных исследований являются методы на основе ВЭЖХ-МС/МС.

Определено, что остаточные количества антибиотиков амфениколов вызывают увеличение времени, которое необходимо для производства молочных продуктов, из-за их ингибирующего действия на молочнокислые бактерии.

Исследуемой проблеме посвящено ограниченное количество научных работ. Следовательно, необходимы исследования, направленные на расширение аналитических методов оценки содержания антибиотиков в продукции и изучение влияния антибиотиков на готовую продукцию, т. е. необходимо, помимо контроля за уровнем максимально допустимого содержания антибиотиков в молоке для обеспечения токсикологической безопасности, установить уровень содержания антибиотиков для обеспечения безопасности технологических этапов.

ГЛАВА 2. ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей главе рассмотрена организация выполнения работы, охарактеризованы объекты и основные методы исследований.

2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента

Теоретические и экспериментальные исследования выполнены, в соответствии с поставленными задачами, в Лаборатории физико-химических исследований фармакологически активных и природных соединений и в Лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный университет». Общая схема исследований представлена на рисунке 2.1.1.

Весь цикл исследований состоял из трех блоков: теоретического, экспериментального и практического. Теоретический этап работы заключался в изучении отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, на основе которой формировали цель и задачи исследования.

Экспериментальный блок исследований состоял из нескольких логически взаимосвязанных этапов. Первый этап исследований посвящен мониторингу биобезопасности молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области – Кузбасса по содержанию антибиотиков в период с 2018 по 2022 гг. Определен основной контролируемый сегмент продуктов животноводства и основная группа антибиотиков для проведения исследований.



Рисунок 2.1.1 – Схема проведения исследований

Третий этап исследований связан с изучением дифференцированного влияния антибиотиков амфениколов на сырое молоко. Определено влияние антибиотиков группы амфениколов на основные физико-химические показатели сырого молока. Установлен характер влияния на микрофлору сырого молока, рассмотрены его микробиологические характеристики. Проведены исследования по выявлению характера влияния различных концентраций хлорамфеникола на основные технологические свойства заквасок, установлен характер воздействия антибиотика в молоке на кинетику роста и развитие заквасочных культур *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei*. Определено влияние антибиотика на качество и безопасность кисломолочных продуктов.

На четвёртом этапе были проведены исследования, направленные на оптимизацию метода одновременного определения трех антибиотиков группы амфениколов методом ВЭЖХ-МС/МС. Для идентификации исследуемых антибиотиков подбирали параметры масс-спектрометрического детектирования. Подтверждение эффективности метода оценивали за счет осуществления сравнительного анализа разработанного и гостированного методов определения антибиотиков. Проводили валидацию разработанной методики определения антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции.

Проведенные исследования позволили составить схему пробоподготовки образцов для контроля остаточного содержания антибиотиков группы амфениколов в молоке и продуктах его переработки при лабораторной диагностике, а также сформировать рекомендации и методические указания по применению оптимизированного метода по определению остаточных количеств антибиотиков группы амфениколов. Оптимизированный метод контроля антибиотиков группы амфениколов внедрен в практику производственной лаборатории ООО «Южский молочный завод» (г. Южа), лаборатории технохимического контроля и арбитражных методов анализа ФГАНУ «ВНИМИ» (г. Москва) и научно-исследовательской лаборатории микробиологии и биотехнологии ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта» (г. Калининград).

2.2 Объекты исследований

Объектами исследований являлись:

- молоко сырое крупного рогатого скота, полученное от сельскохозяйственного производственного кооператива «Береговой», Кемеровская область;
- штаммы молочнокислых бактерий коллекции ФГБУ «ГосНИИгенетики и селекции промышленных микроорганизмов Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”» (таблица 2.2.1);
- закваска для йогурта с пробиотическими культурами *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* и *Lactobacillus casei* (ООО «Бакздрав», Россия).

Таблица 2.2.1 – Штаммы молочнокислых бактерий, отобранные для оценки влияния антибиотиков на биобезопасность молока и молочных продуктов

| № п/п | Название микроорганизма | Номер ВКПМ | Параметры культивирования (тип питательной среды, температура) |
|-------|---|------------|--|
| 1 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | В-2011 | MRS, 37 °С |
| 2 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> | В-5004 | MRS, 35–37 °С |
| 3 | <i>Lactobacillus casei</i> | В-4542 | MRS, 35–37 °С |

При выполнении исследований использовали отечественные и импортные реактивы, которые имели степень чистоты не ниже химический чистый. В качестве сырья и расходных материалов использовались:

- тест-пластины 3М Petrifilm 6477 (Petrifilm, США);
- тест-пластины 3М Petrifilm 6406 (Petrifilm, США);
- тест-пластины 3М Petrifilm 6415 (Petrifilm, США);
- тест-пластины 3М Petrifilm 6414 (Petrifilm, США);
- тест-пластины 3М Petrifilm 6493 (Petrifilm, США);
- тест-пластины 3М Petrifilm 6461 (Petrifilm, США);

– картридж для твердофазной экстракции Strata C-18E 500 мг/6 см³, 500 мг/12 см³ (Phenomenex, США);

– фильтры мембранные (PTFE с размером пор 0,2 мкм, США);

– карбинол (ГОСТ 6995-77, х.ч., Россия);

– н-гексан (ТУ 2631-158-44493179-13 х.ч., Россия);

– ацетонитрил (HPLC, Sigma-Aldrich, США);

– вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);

– деионизованная вода, соответствующая ОСТ 11.029.003-80;

– муравьиная кислота (CATROSA, 98 %, Россия).

В работе использовались стандартные растворы антибиотиков:

– стандартный образец хлорамфеникол (с содержанием основного вещества 99,9 %, Sigma-Aldrich, США);

– стандартный образец флорфеникол (с содержанием основного вещества 99 %, Sigma-Aldrich США);

– стандартный образец флорфеникол амин (с содержанием основного вещества 99,3 %, Sigma-Aldrich США);

– стандартный образец хлорамфеникол-Д5 (с содержанием основного вещества 98 %, Sigma-Aldrich США).

При выполнении исследований использовали следующее научно-исследовательское оборудование:

– анализатора молока Клевер-2 (ООО НПП БИОМЕР, Россия);

– RTS-8 plus («BioSan SIA», Латвия);

– хроматомасс-спектрометр LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония);

– хроматограф жидкостный Shimadzu Corporation (Япония), состоящий из блоков: жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8040, вакуумный дегазатор элюента DGU-20 A5R, насосы высокого давления для подачи элюента LC-20ADx_r, встроенный системный контроллер для управления работой блоков системы CBM-20A lite, устройство для автоматического ввода образцов (автосамплер) со встроенным термостатом для проб SIL-20ACx_r, термостат для колонок CTO-20AC № L20215477487US;

- жидкостный хроматограф LC-20 (Shimadzu, Япония);
- ПО LadSolutions LCMS Release5.86. SP1;
- жидкостной хроматограф Waters Aquity UPLC (Waters, США);
- гибридный квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр XEVO QTOF (Waters, США);
- генератор азота Zefiro LCMS 35 (Cinel, Италия);
- спектрофотометр UV 1800 (Shimadzu, Япония);
- колонка хроматографическая PerfectSil 100 ODS-3 3 μm , 150×3,0 мм (MZ-ANALITICAL, Германия);
- колонка хроматографическая ACQUITY UPLC BEH Phenyl 2,1×50 мм, 1,7 мкм, 130Å (Waters, Ирландия);
- весы электронные аналитические BP 110S (Sartorius, Германия);
- весы лабораторные электронные ВЛТЭ-510С (ООО НПП «Госметр», Россия);
- рН-метр-термометр Нитрон-рН (ООО НПП «Биомер», Россия);
- электрическая плита (электронагреватель) HS-201 («Supra», Россия);
- магнитная мешалка, MS-01 («Elmi», Латвия);
- дозатор ДПОП-1-0,2-2 (Thermo Scientific, США);
- дозатор ДПОП-1-1-10 (Thermo Scientific, США);
- дозатор ДПОП-1-5-50 (Thermo Scientific, США);
- дозатор ДПОП-1-20-200 (Thermo Scientific, США);
- дозатор ДПОП-1-100-1000 (Thermo Scientific, США);
- дозатор ДПОП-1-1000-5000 (Thermo Scientific, США);
- мини-ротатор BIOSAN RS-24 (BIOSAN, Латвия);
- центрифуга лабораторная рефрижераторная Eppendorf 5804R (ООО «Эппендорф Раша», Россия);
- концентратор испарительный ECTS10_1 (АО «Аквилон», Россия);
- ультразвуковая ванна УЗВ-2,8 ТТА («Сапфир», Россия);
- вакуумная установка для ТФЭ АН0-6023 (АО «Аквилон», Россия)
- система фильтрации и очистки воды и водных растворов Direct-Q 3 UV Millipore (Merck Millipore, США);

– шейкеры-инкубаторы ISS-4075 («JEIO TECH», Республика Корея).

2.3 Методы проведения исследований

Проведение мониторинга биобезопасности, а именно оценка содержания антибиотиков группы амфениколы в молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области, осуществлялось путем статистического анализа данных результатов лабораторных исследований на остаточное количество антибиотиков при помощи автоматизированной системы «Веста» (Россельхознадзор). Согласно таким нормативным документам Российской Федерации, как ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции», исследуемая проба считалась «положительной», если остаточное количество антибиотиков группы амфениколы превышало или было равно норме ПДК 0,0003 мг/кг [117, 118].

Для установления характера влияния антибиотиков группы амфениколы (хлорамфеникол, флорфеникол и флорфеникол амин) были проведены исследования по изучению их влияния на основные физико-химические показатели молока при различных температурных режимах (8 ± 2 , 25 ± 2 и 37 ± 2 °С) в динамике. Концентрации антибиотика варьировали от 0,0001 до 0,0027 мг/кг.

Для определения массовой доли белка, сухого обезжиренного молочного остатка жира (СОМО) и белка в сыром молоке использовали анализатор молока Клевер-2 (ООО НПП БИОМЕР, Россия). Принцип действия анализатора основан на измерении параметров ультразвука в молоке в зависимости от температуры и состава молока. Хранение молока и подготовку его к анализу проводили по МВИ 2007.24.01/2 [70]. Исследуемая проба на начало работы являлась однородной, ее температура в момент заливки в анализатор поддерживали на уровне комнатной 20 ± 2 °С. Измерение и анализ полученных данных проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Определение массовой доли лактозы в сыром молоке осуществляли в соответствии с ГОСТ 34304-2017 «Молоко и молочные продукты. Метод определения лактозы и галактозы» [45]. Метод основан на гидролизе лактозы, содержащейся в освобожденном от жира и белка водном экстракте пробы молока.

Исследование по определению титруемой кислотности осуществляли в соответствии с ГОСТ 3624-92 «Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности» с применением индикатора фенолфталеина [46].

Для оценки дифференцированного воздействия антибиотиков на микрофлору сырого молока, исследовали их влияние в различных концентрациях (0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0009 и 0,0027 мг/кг) при различных температурных режимах. Для исследования влияния антибиотиков на молочнокислые бактерии контрольные и опытные образцы молока выдерживали при 35 ± 2 °С. Для исследования влияния антибиотиков на КМАФАнМ контрольные и опытные образцы молока выдерживали при 35 ± 2 °С. Для исследования влияния антибиотиков на дрожжи и плесневые грибы контрольные и опытные образцы молока выдерживали при 25 ± 2 °С. Подсчет образующихся колоний микроорганизмов проводили с использованием тест-пластин 3 М Petrifilm («Petrifilm», США).

Для получения достоверных результатов исследований и подсчета образующихся колоний микроорганизмов готовили ряд разведений исследуемых образцов молока. Разведение осуществляли в дистиллированной воде – гидромодуль 1:10. Дистиллированную воду в объеме 9 см³ разливали по пробиркам и стерилизовали. Для стерилизации в работе использовали вертикальный паровой стерилизатор DGM-500 («DGM», Швейцария), параметры автоклавирования: $120,0 \pm 5,0$ и $15,0 \pm 0,5$ мин. После завершения стерилизации образцы со стерильной водой охлаждались до 25 ± 2 °С. Исследуемые образцы молока отбирали дозатором ДПОП-1-100-1000 (Thermo Scientific, США) в количестве 1 см³ и переносили в пробирку с водой. Пробирку перемешивали и отбирали полученную суспензию дозатором в количестве 1 см³, затем помещали в чистую пробирку с водой. Подобным образом проводили последующие 4 разведений до шестого порядка (1:100000). Далее отбирали 1 см³ суспензии с разведением 1:100000 и наносили на тест-пластину.

После окрашивания колоний микроорганизмов за счет специального индикатора в составе селективной среды производили их подсчет.

Для проведения исследования по определению влияния антибиотиков на метаболизм молочнокислых бактерий готовили маточные закваски чистых культур промышленных штаммов молочнокислых бактерий: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, которые вносили в пастеризованное молоко. Процесс ферментации проводили при 40 ± 2 °С до образования плотного сгустка кислотностью 95–100 °Т контрольного образца. Для культивирования использовались шейкеры-инкубаторы ISS-4075 («JEIO TECH», Республика Корея).

Для определения массовой доли жира, белка, лактозы, сухого обезжиренного молочного остатка и титруемой кислотности использовали методы, которые описывались ранее при исследовании аналогичных показателей для сырого молока.

Для изучения влияния концентраций антибиотика на динамику развития промышленных штаммов молочнокислых бактерий оценивали прирост полученной биомассы путем культивирования на среде MRS с добавлением стерильного молока при $35,0 \pm 2$ °С в течение 24,0 ч. Измерение количества клеток проводили каждые 2,0 ч. Прирост биомассы оценивался по изменению единиц оптической плотности с помощью персонального мультиканального биореактора RTS-8 plus («BioSan SIA», Латвия). В пробирки вносили растворы антибиотиков с заданными концентрациями и 2,0 % инокулянта исследуемой культуры молочнокислых бактерий (мутность суспензии микроорганизмов 0,5 по МакФарланда с помощью денситометра ДЭН-1 («BioSan SIA», Латвия). Продолжительность культивирования составила 72 ч.

Чувствительность заквасочных культур к антибиотику хлорамфеникол изучали по концентрации органических кислот (молочной, пировиноградной, лимонной, уксусной, оротовой, щавелевой, муравьиной, мочево́й и янтарной) в конце процесса ферментации (40 ± 2 °С, 4–6 ч). Концентрацию органических кислот определяли с помощью ВЭЖХ. Анализ проводился на хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США) с гибридным квадрупольным времяпролетным масс-

спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Анализируемый компонент в объеме 1,0 мм³ инжигируется в колонку ACQUITY UPLC VEN Phenyl (2,1×50 мм, 1,7 мкм, 130Å; Waters, Ирландия). Температура колонки составила 30±5 °С, скорость потока подвижной фазы – 0,5–1,0 см³/мин. В качестве подвижной фазы использовался 0,1 % раствор фосфорной кислоты, 10 мМ КН₂ РО₄ в воде (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель Б). Хроматографическое разделение веществ проводилось в режиме градиентного элюирования. Анализ проводили в режиме регистрации положительных ионов (m/z диапазон 100–1200). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации 130,0 °С, температура десольватации 240,0 °С напряжение капилляра 3,5 кВ, напряжение конуса ввода пробы 30,0 В, скорость подачи азота (д-сольвационный газ) 600 дм³/ч.

Для изучения влияния хлорамфеникола на качество и безопасность кисломолочных продуктов изготавливали продукт – йогурт из молока, содержащего заданные концентрации исследуемого антибиотика (0,0001, 0,0003, 0,0009 и 0,0027 мг/кг). В качестве закваски использовали йогуртовую закваску (ООО «БАКЗДРАВ», Россия), состоящую из заквасочных культур *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Lactobacillus casei*. Йогурт изготавливали в соответствии с ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия» [43]. Закваску вносили в количестве 3 г на 1 л заквашиваемого молока. Процесс ферментации осуществляли при 40±2 °С в термостатной камере в течение 4±2 ч. Конец ферментации определяли по достижению титруемой кислотности 95±3 °Т и образованию сгустка в контрольном образце.

Органолептические показатели йогурта, изготовленного из молока с различной концентрацией хлорамфеникола, оценивали в соответствии с ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия» [43].

Химический состав йогурта, подвергнутого воздействию хлорамфеникола, был оценен с точки зрения изменения таких показателей, как массовая доля белка, жира, лактозы, СОМО и титруемой кислотности – методика представлена ранее.

Для постановки метода на аналитическом приборе проводили приготовление индивидуальных растворов стандартных образцов амфениколов с массовой

концентрацией 0,2 и 0,5 мкг/см³ в деионизированной воде. Приготовление растворов смеси амфениколов с массовой концентрацией 10 и 1 мкг/см³ с и без хлорамфениколом, раствора хлорамфеникола с массовой концентрацией 0,1 мкг/см³ и раствора внутреннего стандарта хлорамфеникола-Д5 с массовой концентрацией 1 мкг/см³, используемых для приготовления градуировочных растворов и проб с добавками, проводили перед проведением исследований.

Для приготовления индивидуальных растворов антибиотиков для постановки метода с массовой концентрацией стандартного образца 200 мкг/см³ в метаноле использовали центрифужные пробирки вместимостью 15 см³. Для этого на аналитических весах ВР 110S (Sartorius, Германия) взвешивали 1,0–5,0 мг каждого стандартного образца в отдельных пробирках.

Затем весовым методом добавляли метанол, массу которого рассчитывали по формуле:

$$m_p = \frac{m \times P_a \times M_a \times \rho}{M_c \times 100 \times C} \quad (2.3.1)$$

где: m_p – масса метанола, г;

m – масса стандартного образца, г;

M_a – молярная масса чистого вещества, г/моль;

M_c – молярная масса соли, г/моль;

P_a – степень чистоты стандартного образца, %;

ρ – плотность метанола, г/см³;

C – концентрация раствора антибиотика C , г/см³.

После приготовления растворы помещали в ультразвуковую баню УЗВ-2,8 ТТА («Сапфир», Россия) на 1 мин. Перед дальнейшим использованием все растворы выдерживали при комнатной температуре в темном месте не менее 20 мин.

Для постановки метода на аналитическом приборе проводили приготовление индивидуальных растворов стандартных образцов амфениколов с массовой концентрацией 0,2 и 0,5 мкг/см³ и раствор смеси стандартных образцов амфениколов

с массовой концентрацией 0,2 мкг/см³ в воде деионизированной согласно данным таблицы 2.3.2.

Таблица 2.3.2 – Приготовление индивидуальных растворов стандартных образцов амфениколов для постановки метода

| Исходный индивидуальный раствор амфеникола | Концентрация раствора, мкг/см ³ | Объем исходного раствора, см ³ | Объем растворителя, см ³ | Растворитель |
|--|--|---|-------------------------------------|-----------------------|
| Хлорамфеникол | 0,2 | 0,001 | 0,999 | Деионизированная вода |
| | 0,4 | 0,002 | 0,998 | Деионизированная вода |
| Флорфеникол | 0,2 | 0,001 | 0,999 | Деионизированная вода |
| | 0,4 | 0,002 | 0,998 | Деионизированная вода |
| Флорфеникол амин | 0,2 | 0,001 | 0,999 | Деионизированная вода |
| | 0,4 | 0,002 | 0,998 | Деионизированная вода |
| Хлорамфеникол-Д5 | 0,2 | 0,001 | 0,999 | Деионизированная вода |
| | 0,4 | 0,002 | 0,998 | Деионизированная вода |
| Хлорамфеникол | 0,2 | 0,001 | 0,996 | Деионизированная вода |
| Флорфеникол | | 0,001 | | |
| Флорфеникол амин | | 0,001 | | |
| Хлорамфеникол-Д5 | | 0,001 | | |

После приготовления растворы помещали в ультразвуковую баню на 1 мин. Перед дальнейшим использованием все растворы выдерживались при комнатной температуре в темном месте не менее 20 мин.

Приготовление растворов смеси амфениколов с массовой концентрацией 10,0 и 1,0 мкг/см³ с и без хлорамфениколом, раствора хлорамфеникола с массовой концентрацией 0,1 мкг/ см³ и раствора внутреннего стандарта хлорамфеникола-Д5 с массовой концентрацией 1,0 мкг/ см³, используемых для приготовления градуировочных растворов и проб с добавками, проводили в виалах из темного стекла вместимостью 40 см³ (таблица 2.3.3).

После приготовления раствор помещали в ультразвуковую баню УЗВ-2,8 ТТА («Сапфир», Россия) на 1 мин. Перед дальнейшим использованием раствор выдерживали при комнатной температуре в темном месте не менее 20 мин.

Для определения специфичности валидируемого метода брали навески 40 образцов каждой матрицы. 20 образцов каждой матрицы обогащали на уровне C_0 , в соответствии с таблицей 2.3.4, и проводили пробоподготовку согласно ГОСТ 54904-2013 [49]. Критерием специфичности для арбитражных методов для обогащенных проб являлся результат измерения «обнаружено» в соответствии с SANCO/10684/2009. Допустимая вероятность ошибки (β -ошибка) должна составлять не более 5 % при $n \geq 20$.

Таблица 2.3.3 – Приготовление растворов смеси амфениколов для приготовления градуировочных растворов и проб с добавками

| Исходный индивидуальный раствор амфеникола | Концентрация амфеникола (каждого) в растворе смеси, мкг/см ³ | Объем раствора индивидуального раствора амфеникола, см ³ | Объем растворителя, см ³ | Растворитель |
|--|---|---|-------------------------------------|--------------|
| Хлорамфеникол | 10,0 (Смесь 3) | 1,25 | 21,250 | Метанол |
| Флорфеникол | | 1,25 | | |
| Флорфеникол амин | | 1,25 | | |
| Флорфеникол | 10,0 (Смесь 4) | 1,25 | 22,500 | Метанол |
| Флорфеникол амин | | 1,25 | | |

Продолжение таблицы 2.3.3

| Исходный индивидуальный раствор амфеникола | Концентрация амфеникола (каждого) в растворе смеси, мкг/см ³ | Объем раствора индивидуального раствора амфеникола, см ³ | Объем растворителя, см ³ | Растворитель |
|--|---|---|-------------------------------------|--------------|
| Хлорамфеникол | 1,0 (Смесь 1) | 0,125 | 24,625 | Метанол |
| Флорфеникол | | 0,125 | | |
| Флорфеникол амин | | 0,125 | | |
| Флорфеникол | 1,0 (Смесь 2) | 0,125 | 24,750 | Метанол |
| Флорфеникол амин | | 0,125 | | |
| Хлорамфеникол | 0,1 | 0,0125 | 24,987 | Метанол |
| Хлорамфеникол-Д5 | 1,0 | 0,125 | 24,875 | Метанол |

Таблица 2.3.4 – Уровни обогащения проб

| Уровень обогащения проб амфениколами, мкг/кг | | Концентрация раствора смеси амфениколов для обогащения, мкг/см ³ | Объем раствора смеси амфениколов, см ³ | Объем раствора внутреннего стандарта, см ³ |
|--|-------------------------|---|---|---|
| С ₀ | 0,2 (хлорамфеникол) | 0,1 (хлорамфеникол) | 0,002 (хлорамфеникол) | 0,040 |
| | 1,0 | 1,0 (Смесь 2) | 0,001 | 0,040 |
| С ₁ | 0,2 (хлорамфеникол) | 0,1 (хлорамфеникол) | 0,002 (хлорамфеникол) | 0,040 |
| | 50,0 | 10,0 (Смесь 3) | 0,005 | 0,040 |
| С ₂ | 0,3 (хлорамфеникол) | 0,1 (хлорамфеникол) | 0,003 (хлорамфеникол) | 0,040 |
| | 100,0 | 10,0 (Смесь 3) | 0,010 | 0,040 |
| С ₃ | 0,45 (хлорамфеникол) | 0,1 (хлорамфеникол) | 0,005 (хлорамфеникол) | 0,040 |
| | 150,0 | 10,0 (Смесь 3) | 0,015 | 0,040 |

Пробоподготовка. Молоко, сливки, сметану, кисломолочные напитки и продукты, сухие молочные продукты перед анализом тщательно перемешивали. Сыр, творог или творожные изделия тщательно растирали в фарфоровой ступке. Анализируемую пробу измельчали и взвешивали на весах в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см³ на 1,0 г гомогенизированной пробы. Пипеточным дозатором в пробирку вносили 0,04 см³ раствора внутреннего стандарта хлорамфеникола-Д5, приготовленного согласно таблице 2.3.3. Пробирку помещали в шейкер для перемешивания на 15 мин. Через 15 мин приливали 4 см³ ацетонитрила и помещали пробирку на 15 мин в шейкер для экстракции. Затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. После центрифугирования верхний органический слой переливали в другую полипропиленовую пробирку вместимостью 15 см³, помещали на нагревательный модуль и упаривали в токе воздуха при температуре 40 °С до 0,1–0,2 см³. К полученному остатку приливали 2 см³ деионизированной воды, перемешивали и центрифугировали со скоростью 4000 об/мин в течение 15 мин при температуре 4 °С. Центрифугат использовали для твердофазной экстракции [49].

Картриджи для твердофазной экстракции кондиционировали на вакуумном устройстве для твердофазной экстракции, пропуская последовательно 2 см³ ацетонитрила и 2 см³ деионизированной воды. Затем через картридж Strata C-18E 500 мг/6 см³, 500 мг/12 см³ (Phenomenex, США) пропускали анализируемый центрифугат пробы. На всех этапах твердофазной экстракции, кроме этапов сушки, вакуум или избыточное давление не применяли. Промывали картридж 2 см³ деионизированной водой, затем сушили 10 мин. Далее элюировали аналиты 2 см³ ацетонитрила. Элюат упаривали на нагревательном модуле в токе воздуха до 0,1 см³ при температуре 40 °С. Для перерастворения и подготовки к хроматографическому анализу объем полученного упаренного элюата доводили до 1 см³ деионизированной водой и помещали на ультразвуковую баню на одну минуту. Полученный экстракт фильтровали через мембранный фильтр в вialу для хроматографирования вместимостью 2 см³ и использовали для ВЭЖХ-МС/МС анализа [49].

Линейность определяли исследованием не менее 5 уровней концентраций, каждый уровень был определен не менее 3 раз. Для определения линейности строили калибровочную кривую. При построении калибровочной кривой концентрации калибровочных стандартов охватывали ожидаемый концентрационный диапазон. Критерием линейности являлся коэффициент корреляции – не менее 0,99 для хроматографических методов (2002/657/ЕС) [99].

Для установления точности, сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости, в соответствии с планом эксперимента (таблица 2.3.5), образцы матрицы обогащали на уровне C_1 – C_2 в соответствии с таблицей 2.3.4. После этого проводили исследования на приборе.

Основным критерием точности является истинность. Она может быть установлена только с помощью сертифицированного эталонного материала. Для определения истинности нужно:

- отобрать 18 бланков образца и обогатить 6 из них на уровне 1, 1,5 и 2-кратном минимальном требуемом рабочем пределе или 0,5; 1 и 1,5-кратном разрешенном пределе;

- подсчитать среднее стандартное отклонение и коэффициент вариации (восстановление) (%) для этих концентраций:

$$\text{Восстановление} = \frac{100 \times \text{измеренное содержание}}{\text{уровень обогащения}} \quad (2.3.1)$$

При валидации методики сходимость определяли путем исследования проб, обогащенных аналитом на трех различных уровнях концентрациях: в 1, 1,5 и 2 раза больше минимального рабочего предела или в 0,5, 1 и 1,5 раз больше разрешенного предела. Также проводился анализ проб и вычислялась концентрация, обнаруженная в каждой пробе. Затем определялись средняя концентрация, стандартное отклонение и коэффициент вариации (%) обогащенных проб. Критерием оценки повторяемости служит коэффициент вариации (RSD_r , %), значение которого должно соответствовать 2002/657/ЕС [99]:

$$RSD_T \leq 0,67 \times RSD_R \quad (2.3.2)$$

где RSD_R – межлабораторный коэффициент вариации (%), определяемый с помощью уравнения Гурвица по формуле:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (2.3.3)$$

где C – массовая доля, выраженная в степени (экспоненте) 10 (например, 1 мг/г = 10^{-3}).

Эксперимент по определению внутрилабораторной воспроизводимости проводили по аналогии с экспериментом по определению повторяемости.

Критерием оценки воспроизводимости являлось значение коэффициента внутрилабораторной воспроизводимости (RSD_{wR}), которое не должно превышать величину коэффициента вариации сходимости (RSD_T).

Результаты обрабатывались методами математической статистики, анализ данных проводился с использованием методов дисперсионного и регрессионного анализа, был разработан дизайн экспериментов. Результаты многофакторных экспериментов обрабатывались с помощью модуля проектирования процессов программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2007, США). Данные, полученные на разных образцах, сравнивались с помощью распределений Фишера и Стьюдента. Визуализацию теоретических и экспериментальных данных и расчет индексов проводили с помощью MS Excel и пакета прикладных программ.

Таблица 2.3.5 – План эксперимента по установлению точности

| Оператор № | День 1 | День 2 | День 3 | День 4 | День 5 | День 6 | День 7 | День 8 | День 9 |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | C ₂₋₆ образцов | C ₁₋₆ образцов | C ₃₋₆ образцов | C ₂₋₆ образцов | C ₁₋₆ образцов | C ₃₋₆ образцов | C ₂₋₆ образцов | C ₁₋₆ образцов | C ₃₋₆ образцов |
| 2 | C ₁₋₆ образцов | C ₃₋₆ образцов | C ₂₋₆ образцов | C ₁₋₆ образцов | C ₃₋₆ образцов | C ₂₋₆ образцов | C ₁₋₆ образцов | C ₃₋₆ образцов | C ₂₋₆ образцов |

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава посвящена проведению мониторинга биобезопасности, а именно оценке содержания антибиотиков группы амфениколов в молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области – Кузбасса. Рассмотрено влияние антибиотиков группы амфениколов на сырое молоко. Рассмотрен характер влияния различных концентраций антибиотиков на основные технологические свойства заквасок: на кинетику роста и развитие. Рассмотрено влияние антибиотиков, содержащихся в молоке, на качество и безопасность кисломолочных продуктов.

3.1 Мониторинг биобезопасности молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области по содержанию антибиотиков

Мониторинг антибиотиков амфениколов, обнаруженных в продуктах по Кемеровской области, проводили путем сбора и анализа статистических данных Государственного управления ветеринарии Кемеровской области – Кузбасса и Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, а также собственных исследований. В ходе лабораторных исследований по определению остаточных количеств антибиотиков проанализировано более 8,5 тыс. проб животноводческой продукции производителей Кемеровской области – Кузбасса. С помощью методов статистического анализа данных установлено, что амфениколы, тетрациклины, пенициллины, нитрофураны и сульфаниламиды содержатся в объектах исследования, представленных на рисунке 3.1.1.

Полученные данные мониторинга биобезопасности пищевой продукции по Кемеровской области позволили выделить целевую группу антибиотиков для проведения дальнейших исследований. Установлено, что наибольшее количество проб (за

период 2018–2022 гг.) содержат антибиотики группы амфениколы – 2033 шт., что на 13,1 % больше количества проб, исследованных на остаточное количество тетрациклинов, и на 14,8 % больше нитрофуранов.

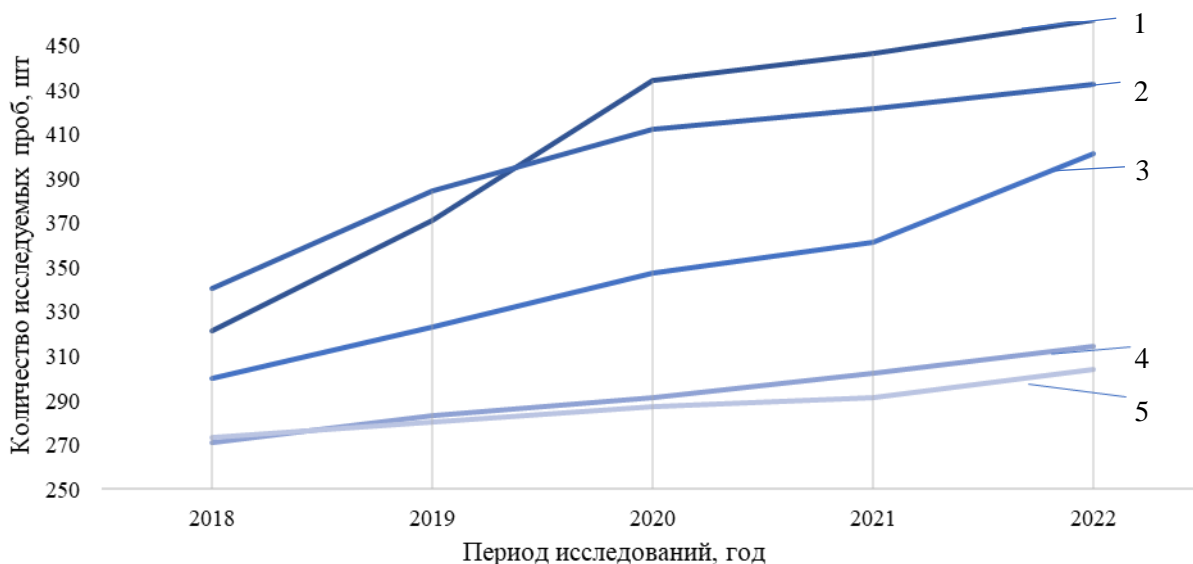


Рисунок 3.1.1 – Результаты мониторинга по содержанию антибиотиков в животноводческой продукции Кемеровской области – Кузбасса: 1 – амфениколы; 2 – тетрациклины; 3 – нитрофураны; 4 – пенициллины; 5 – сульфаниламиды

Антибиотики группы амфениколы являются одними из наиболее востребованных в сегменте сельскохозяйственного рынка. Интерес к данной группе препаратов основывается на доступности и широком спектре их действия. Следует отметить, что применение антибиотиков группы амфениколы запрещены в странах ЕС, т. к. данные препараты обладают высокой токсичностью. Согласно нормативным документам Российской Федерации, таким как ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», допускается содержание хлорамфеникола в количестве не более 0,0003 мг/кг [117].

После выделения целевой группы антибиотиков, содержание которой характерно для животноводческой продукции региона, выделялся сегмент продукции, в котором преобладало содержание амфениколов. Результаты анализа представлены на рисунке 3.1.2.

Анализ полученных данных показал, что наиболее контролируемым сегментом на рынке продуктов питания является молоко и молочная продукция. В период с 2018 по 2022 гг. на содержание остаточного количества амфениколов было исследовано 897 проб молока и продуктов его переработки производителей Кемеровской области – Кузбасса, что составило 44 % от общего объема исследуемого материала.

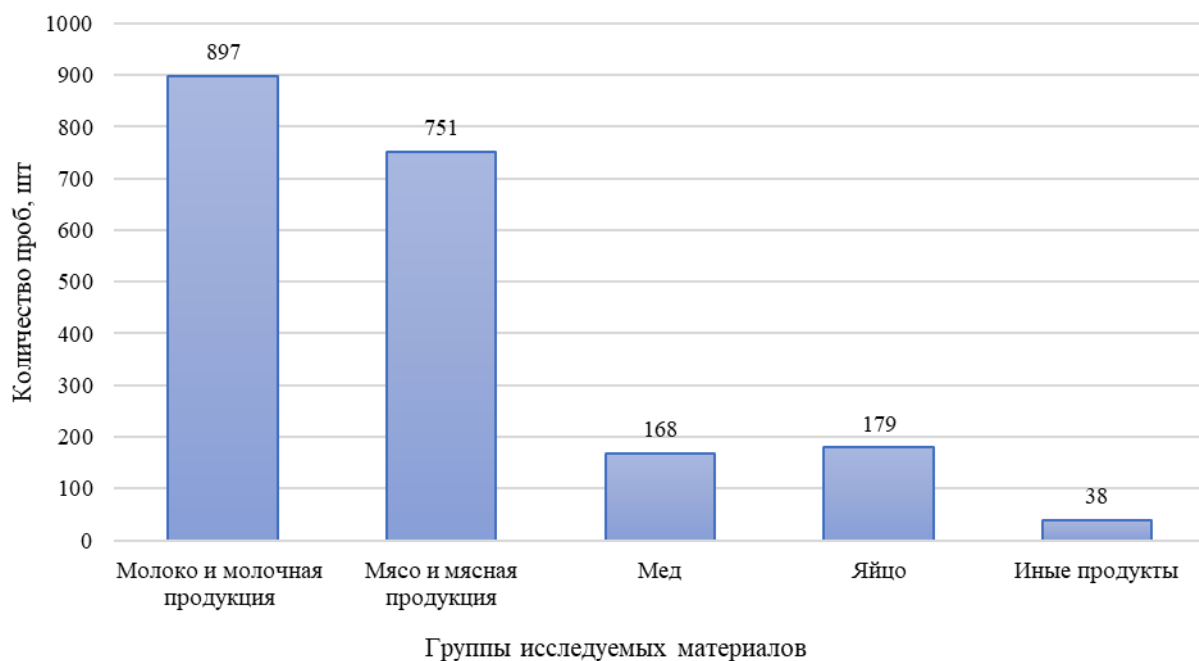


Рисунок 3.1.2 – Основные группы пищевых продуктов, исследуемые на остаточное содержание антибиотиков группы амфениколы в Кемеровской области – Кузбассе

Для установления основной группы продуктов молокоперерабатывающей промышленности производителей Кемеровской области – Кузбасса, подверженной загрязнению антибиотиками группы амфениколов, были проведены исследования по определению наибольшего количества положительных проб с помощью автоматизированной системы «Веста» (Россельхознадзор). За основной показатель мониторинга приняли концентрацию антибиотиков, превышающие значения ПДК (согласно ТР ТС 033/2013) [118]. В качестве исследуемых матриц были выбраны молоко сырое, молоко пастеризованное питьевое, кисломолочные продукты (йогурты, сметана, творог) и детское молочное питание (йогурты, творог, творожки). Результаты оценки содержания амфениколов в сыром молоке, пастеризованном молоке,

кисломолочных продуктах и детском молочном питании представлены в таблице 3.1.1 и на рисунках 3.1.3–3.1.6.

Таблица 3.1.1 – Результаты по определению амфениколов в объектах исследования

| Матрица | Количество проб всего, шт. | Количество положительных проб, шт. | Выявляемость, % |
|------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------|
| Молоко сырое | 179 | 51 | 28,4±0,2 |
| Молоко пастеризованное | 279 | 56 | 20,0±0,1 |
| Кисломолочные продукты | 332 | 63 | 19,0±0,3 |
| Детское питание | 81 | 9 | 11,0±0,1 |
| Всего | 871 | 179 | 20,5±0,2 |

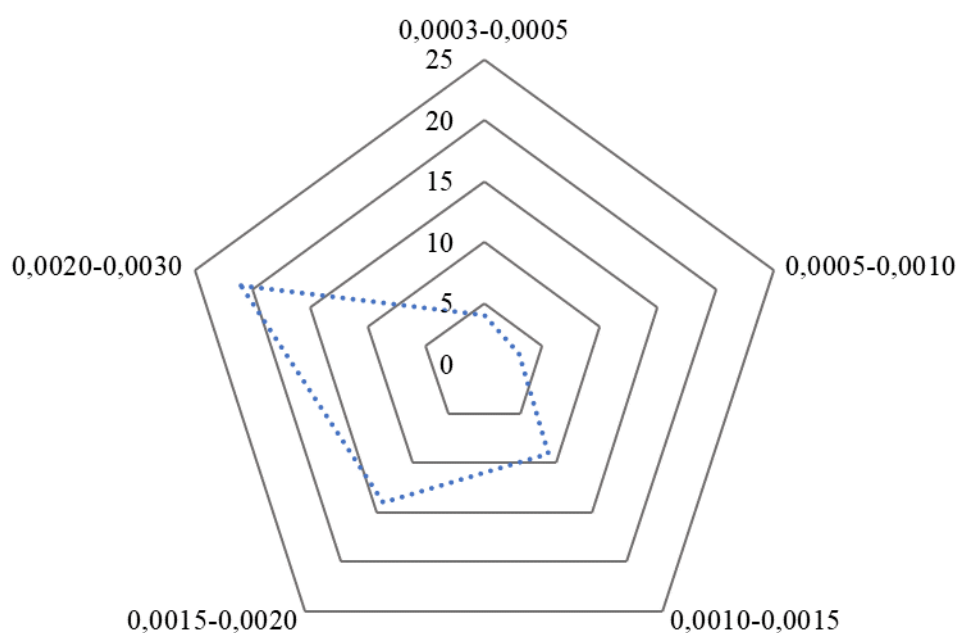


Рисунок 3.1.3 – Содержание амфениколов в положительных пробах сырого молока, мг/кг

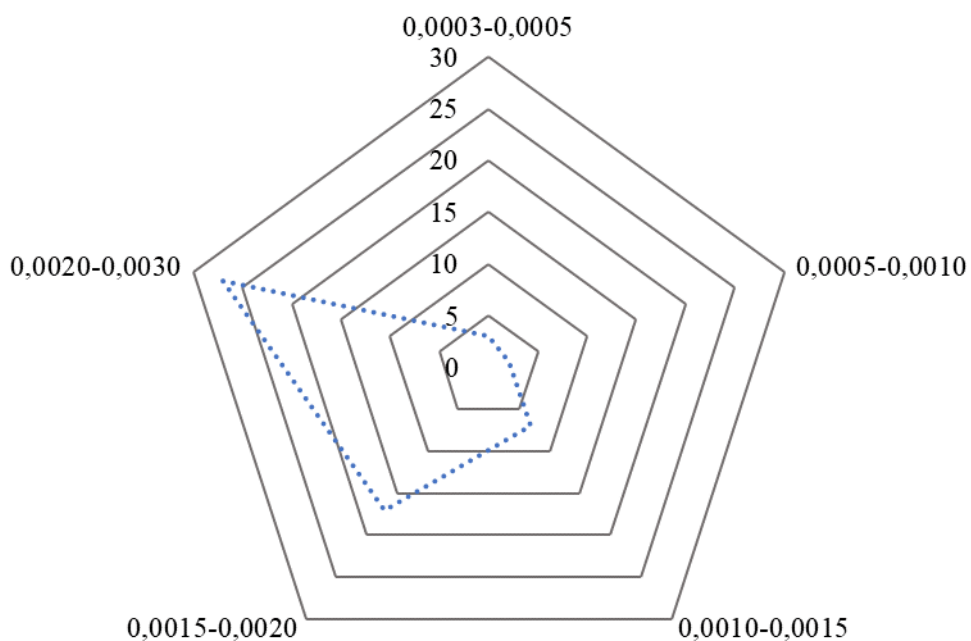


Рисунок 3.1.4 – Содержание амфениколов в положительных пробах пастеризованного молока, мг/кг

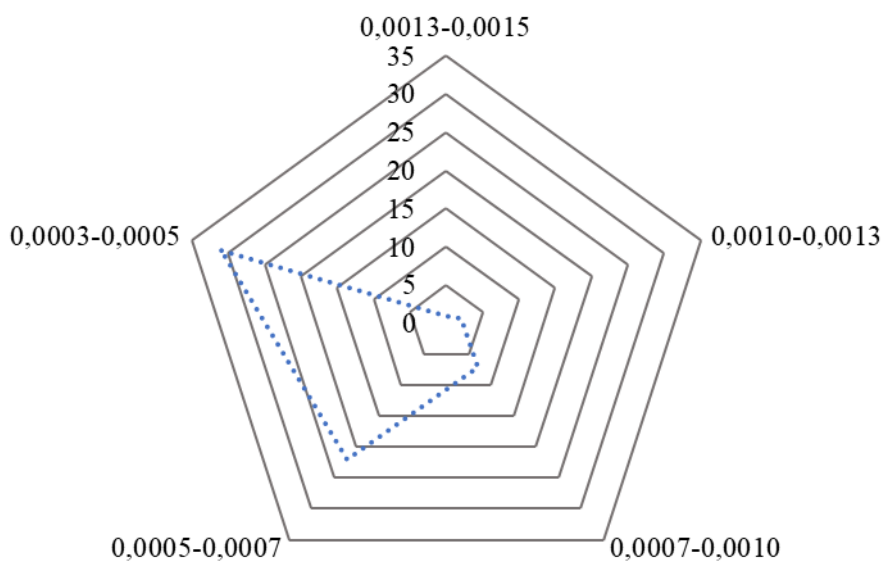


Рисунок 3.1.5 – Содержание амфениколов в положительных пробах кисломолочных продуктах, мг/кг

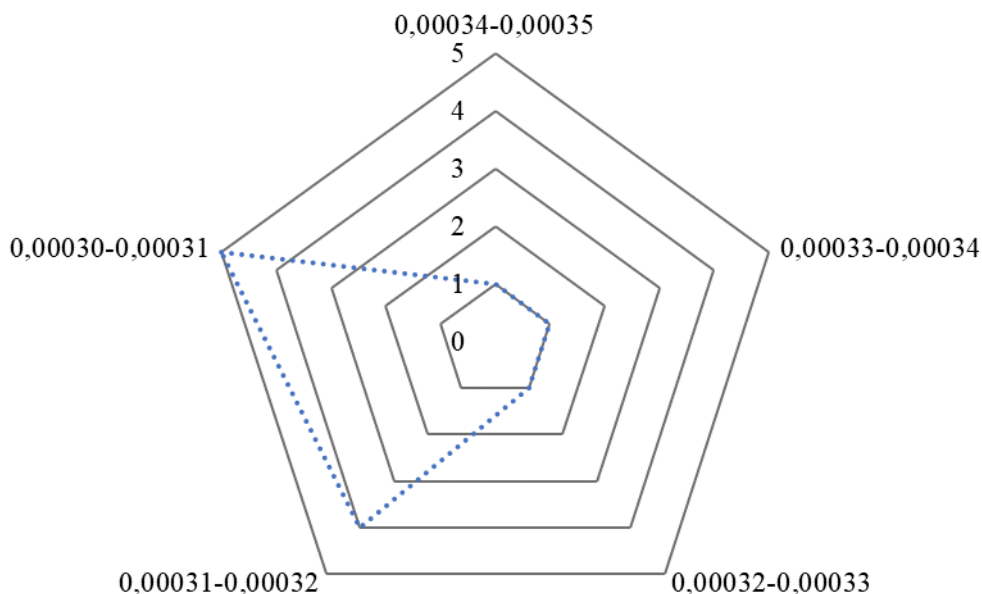


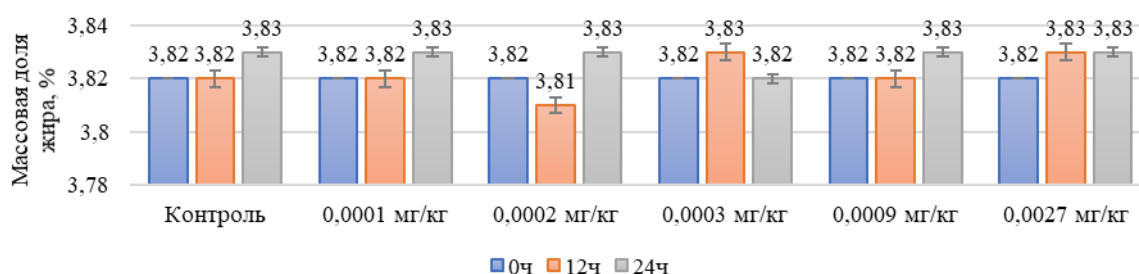
Рисунок 3.1.6 – Содержание амфениколов в положительных пробах детского питания, мг/кг

Результаты показали, что из общего объема проанализированных проб за период с 2018 по 2022 гг. $20,5 \pm 0,1$ % приходится на положительные результаты, т. е. на наличие антибиотиков целевой группы. Наибольшее количество положительных результатов выявлено в сыром молоке (28 %) и молоке пастеризованном (20 %).

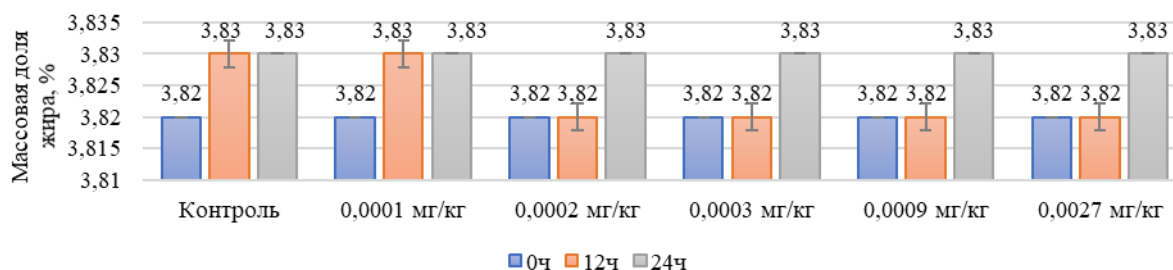
Результаты показали, что наибольшее количество положительных проб исследуемых матриц содержали антибиотик в концентрации от 0,0003 до 0,0005 мг/кг. Установлено, что при исследовании сырого молока четыре пробы имели концентрацию антибиотика в среднем в 6–10 раз больше нормы ПДК. Показано, что детское питание также подвержено загрязнению антибиотиками, их содержание составило 0,00035 мкг/кг. Согласно нормативным документам, содержание лекарственных препаратов в исследуемом сегменте продуктов не допускается.

3.2 Изучение дифференцированного влияния антибиотиков амфениколов на сырое молоко

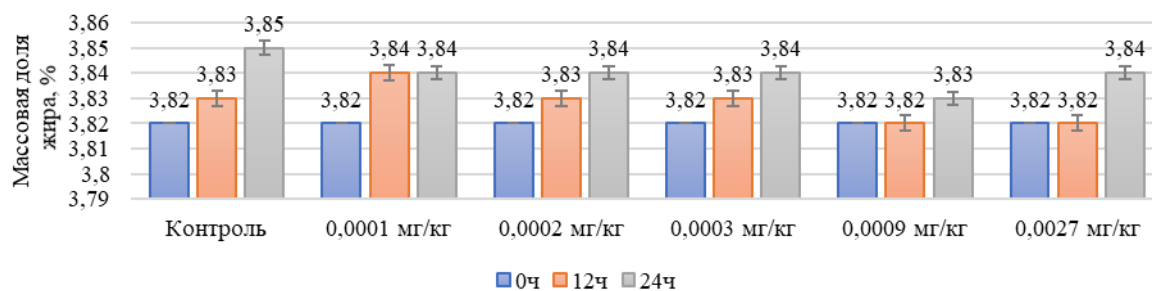
Результаты влияния антибиотиков группы амфениколы (хлорамфеникол, флорфеникол и флорфеникол амин) на физико-химические показатели сырого молока в динамике при различных температурных режимах (8 ± 2 , 25 ± 2 и 37 ± 2 °C) отражены на рисунках 3.2.1–3.2.4. Концентрации антибиотика варьировали от 0,0001 до 0,0027 мг/кг.



а)

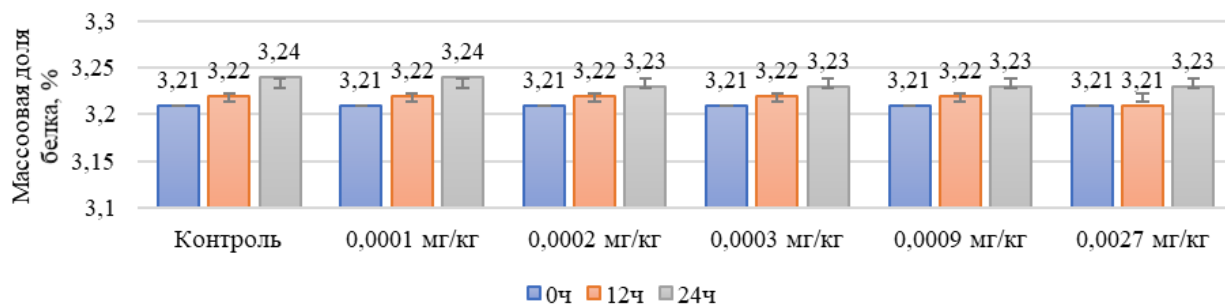


б)

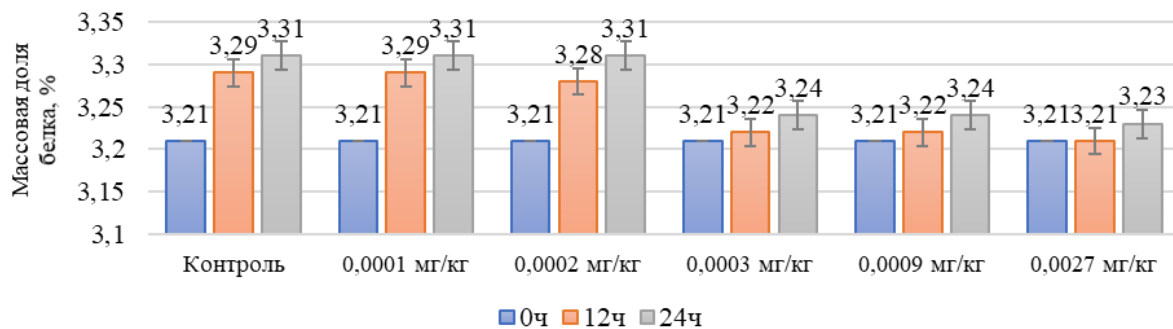


в)

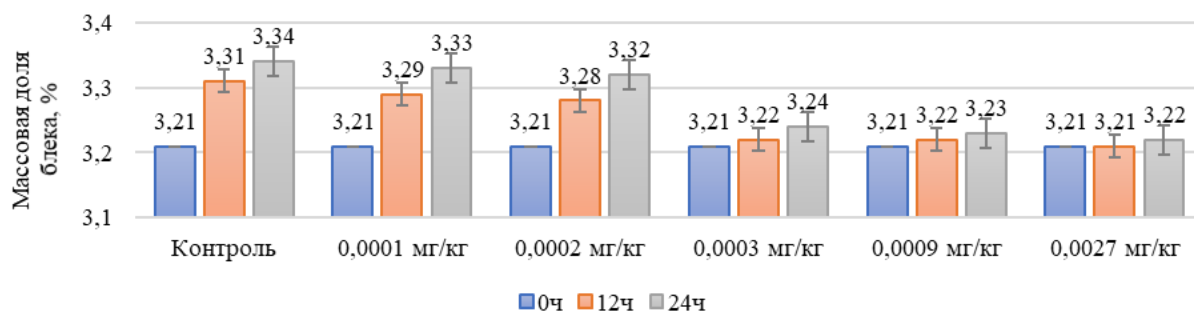
Рисунок 3.2.1 – Влияние хлорамфеникола на массовую долю жира в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °C; б) 25 ± 2 °C; в) 37 ± 2 °C



а)

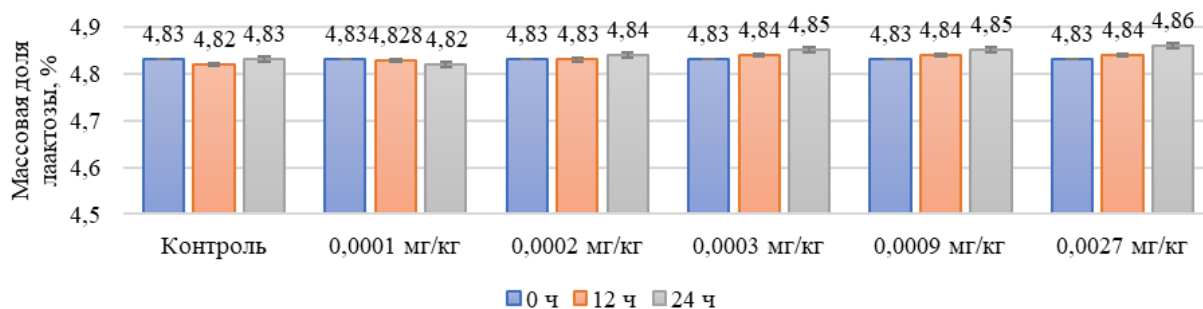


б)

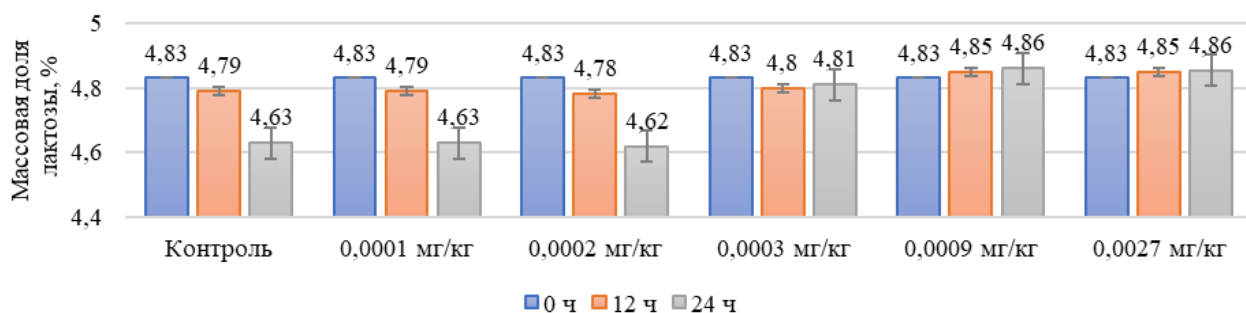


в)

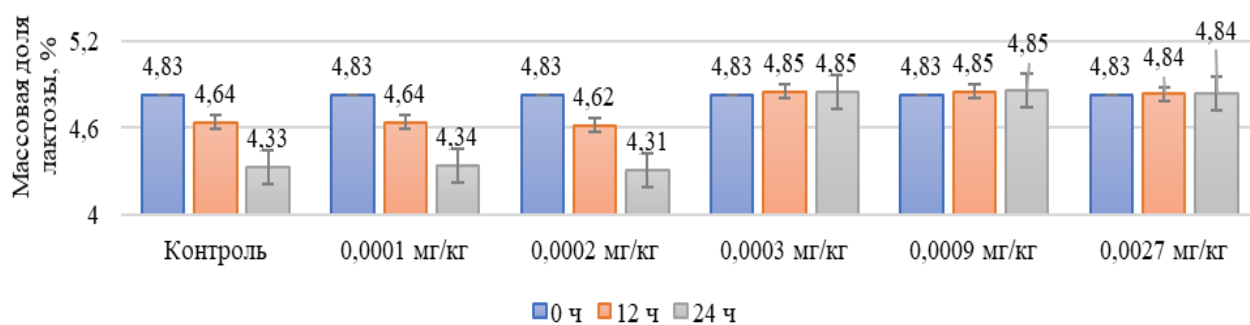
Рисунок 3.2.2 – Влияние хлорамфеникола на массовую долю белка в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °C; б) 25 ± 2 °C; в) 37 ± 2 °C



а)

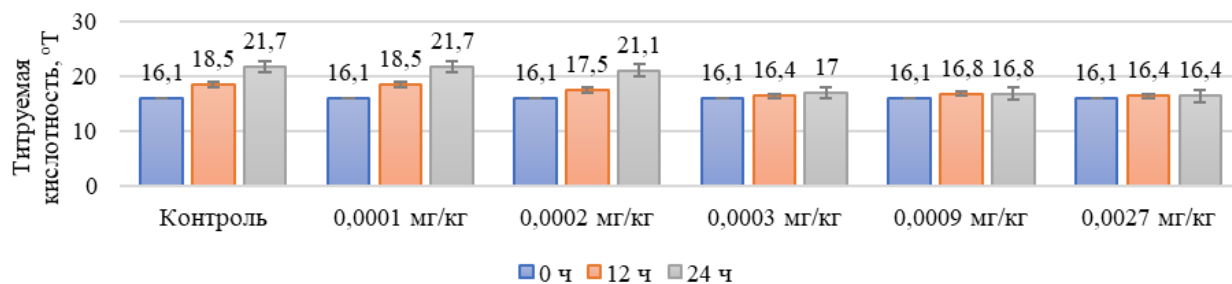


б)

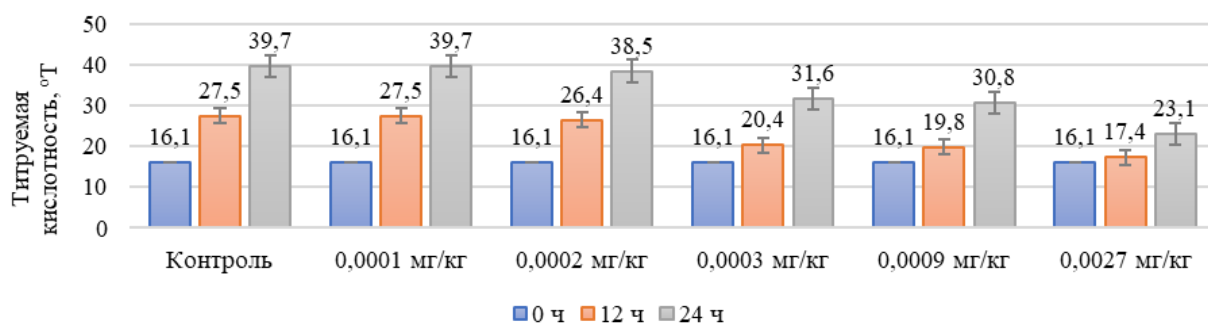


в)

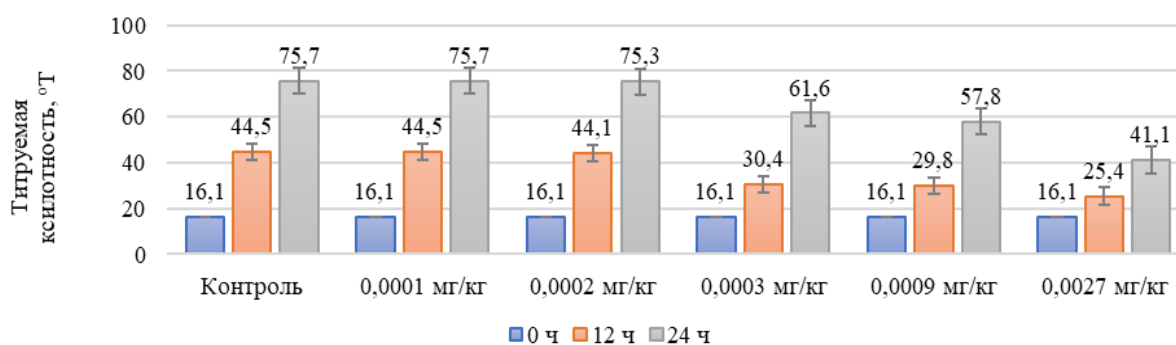
Рисунок 3.2.3 – Влияние хлорамфеникола на массовую долю лактозы в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °C; б) 25 ± 2 °C; в) 37 ± 2 °C



а)



б)



в)

Рисунок 3.2.4 – Влияние хлорамфеникола на титруемую кислотность сырого молока, °Т: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С

В результате проведенного исследования установлено, что статистически достоверных изменений физико-химических показателей в процессе хранения молока при температуре 8 ± 2 °С выявлено не было.

Наличие антибиотика в молоке оказало выраженное влияние на значения титруемой кислотности при 25 ± 2 и 37 ± 2 °С. Установлено, что при 25 ± 2 °С увеличении концентрации антибиотика более 0,0002 мг/кг наблюдалось снижение значений исследуемого показателя. В опытном образце с наибольшей концентрацией антибиотика (0,0027 мг/кг) уровень титруемой кислотности составил 23,1 °Т, что на 41,2 % меньше исследуемого показателя в контрольном образце молока. Аналогичные результаты были отмечены при 37 ± 2 °С. Уровень титруемой кислотности в опытном образце с концентрацией 0,0027 мг/кг составил 23,1 °Т, что на 45,7 % ниже, чем в контрольном.

Установлено, что при температуре хранения молока 25 ± 2 и 37 ± 2 °С антибиотик хлорамфеникол влиял на содержание лактозы в исследуемом молоке. Содержание лактозы в контрольном образце через 24 ч хранения уменьшилось на 4,2 % при 25 ± 2 °С, на 10,5 % при 37 ± 2 °С. В контрольных образцах с концентрацией антибиотика 0,0003 мг/кг и более исследуемый показатель не изменялся (~ 0,2 %).

Такой характер снижения кислотности и содержания лактозы в опытных образцах с концентрациями антибиотика 0,0003 мг/кг и более может свидетельствовать о его ингибирующем действии на молочнокислые бактерии.

Результаты исследования изменения физико-химических свойств сырого молока в присутствии флорфеникола и флорфеникол амина представлены на рисунках 3.2.5–3.2.12.

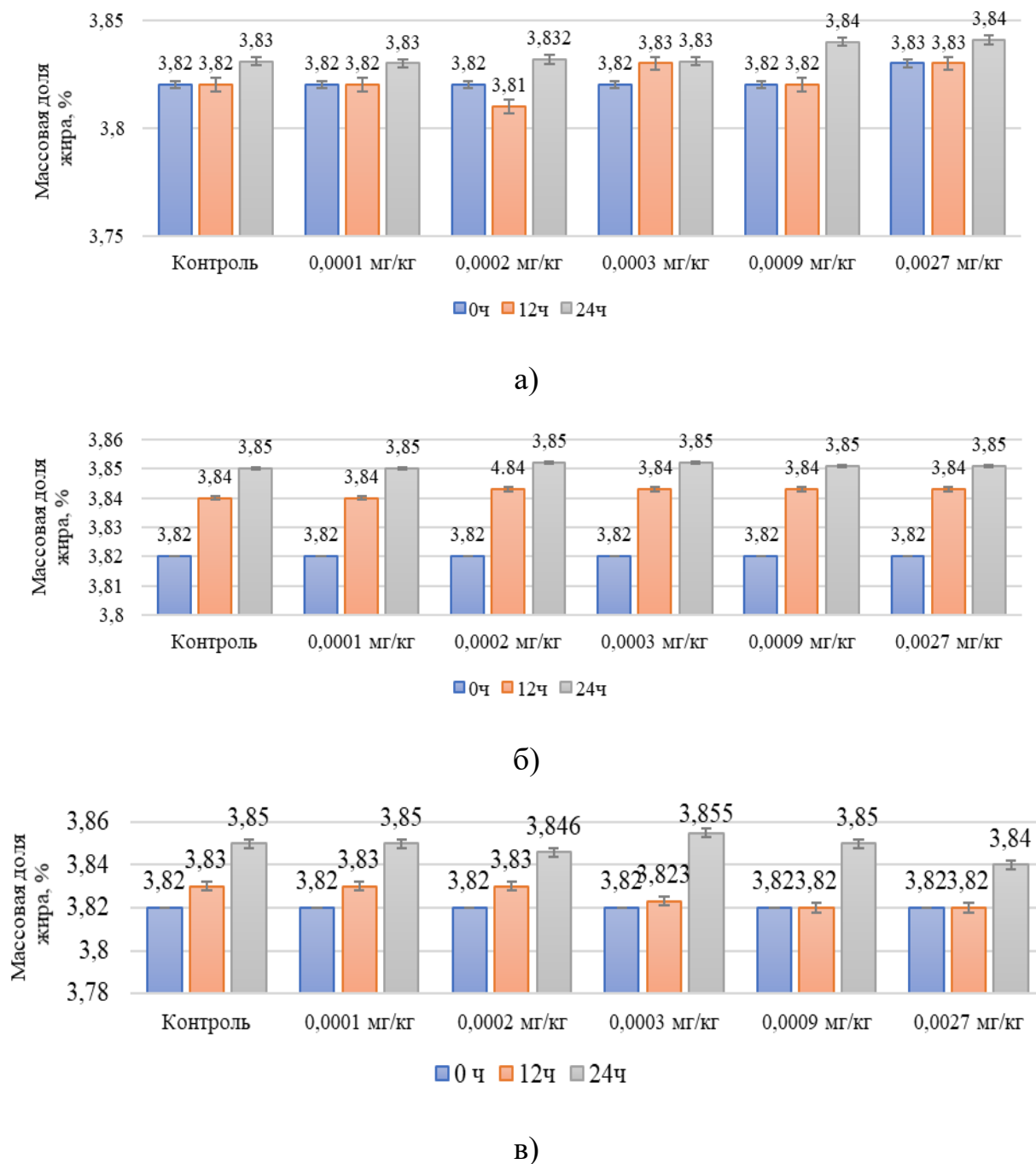
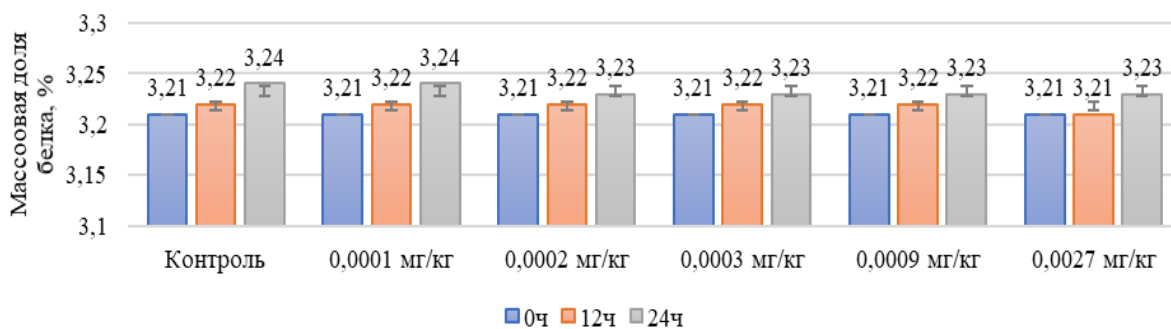
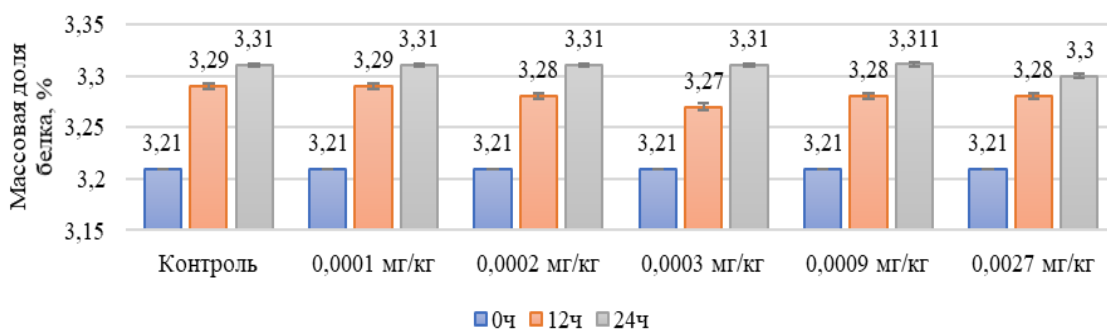


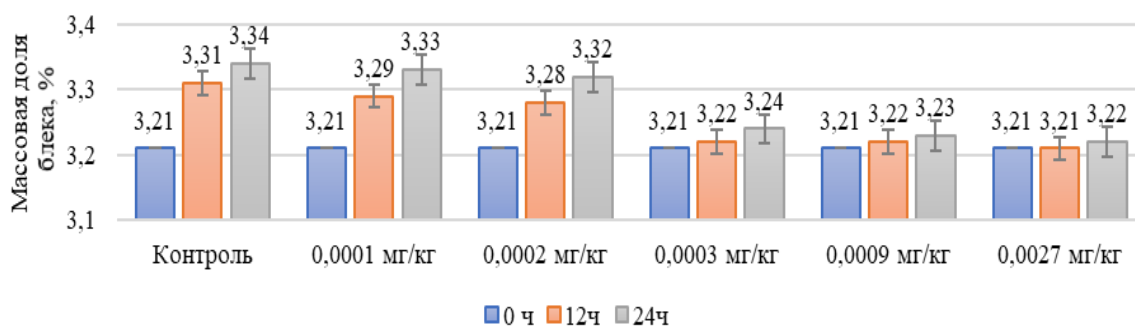
Рисунок 3.2.5 – Влияние флорфеникола на массовую долю жира сырого молока, %: а) 8±2 °C; б) 25±2 °C; в) 37±2 °C



а)

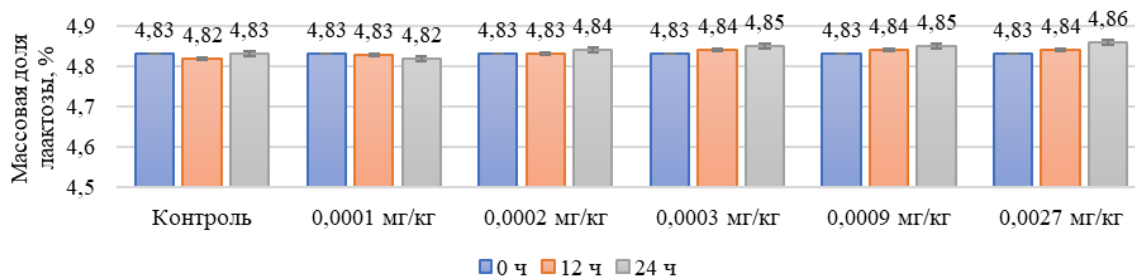


б)

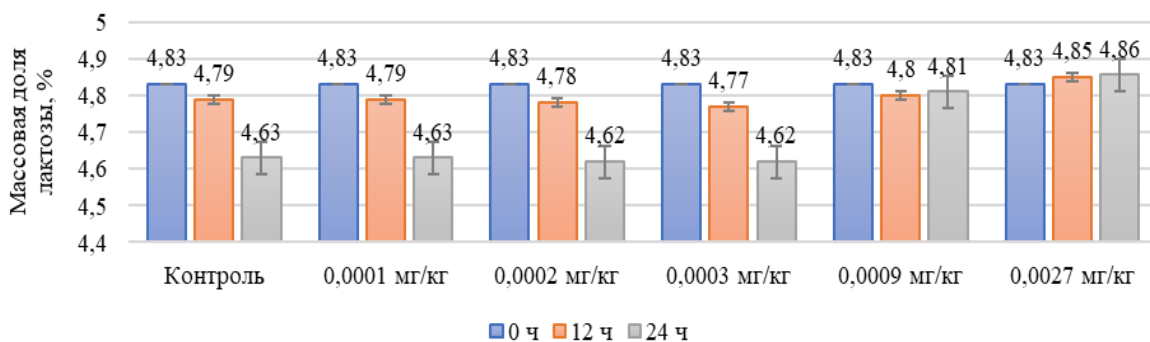


в)

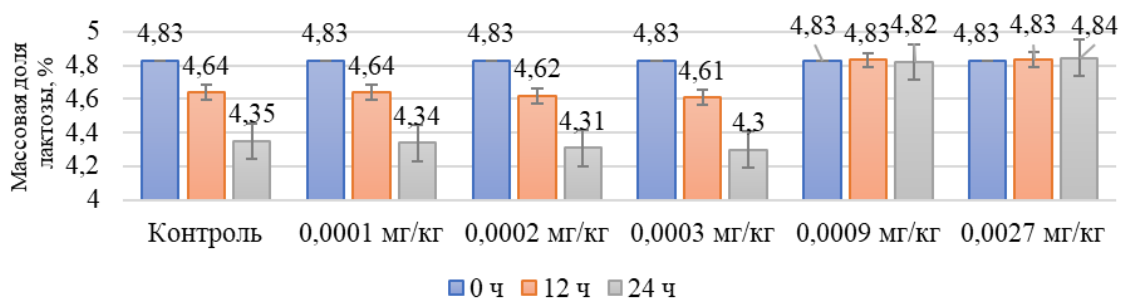
Рисунок 3.2.6 – Влияние флорфеникола на массовую долю белка сырого молока, %: а) 8 ± 2 °C; б) 25 ± 2 °C; в) 37 ± 2 °C



а)

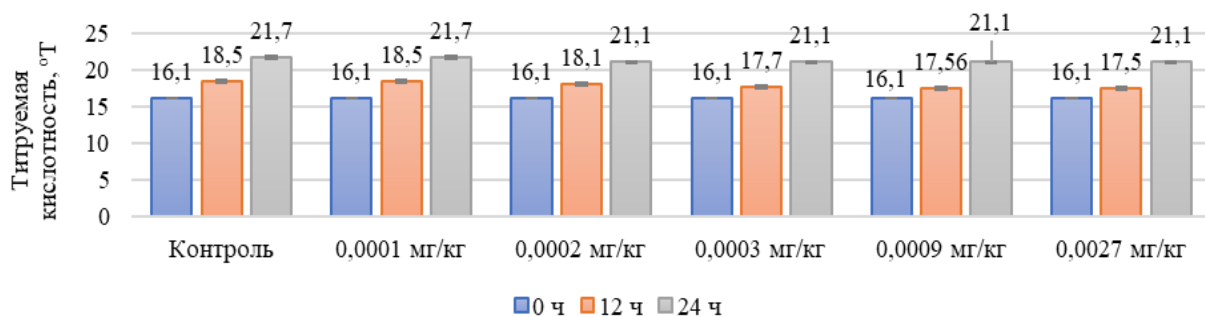


б)

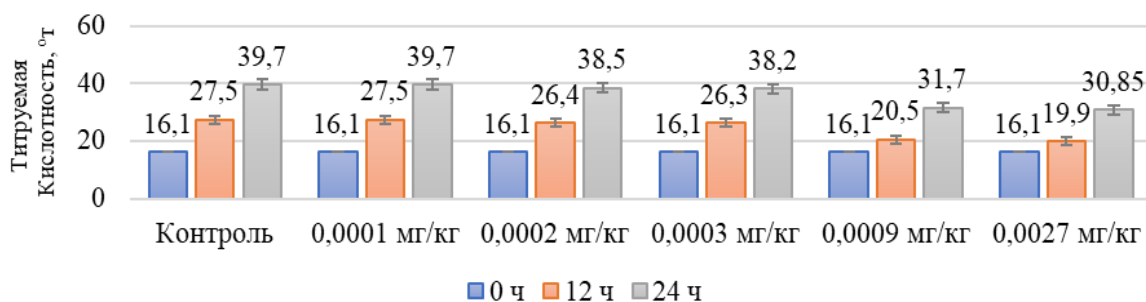


в)

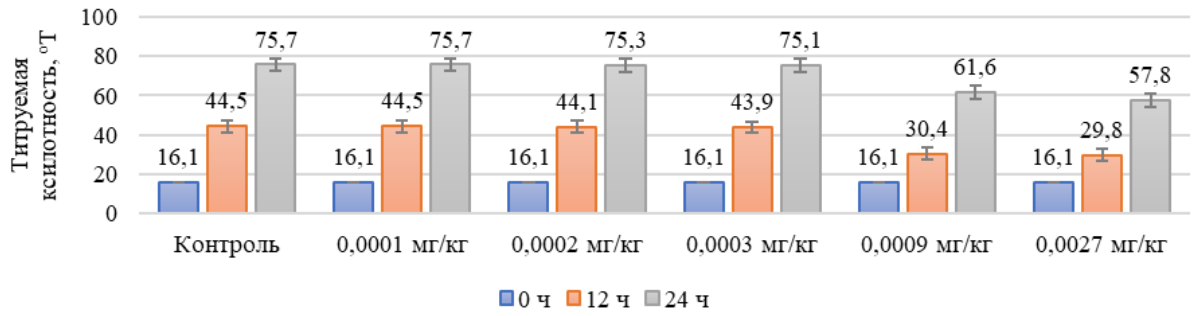
Рисунок 3.2.7 – Влияние флорфеникола на массовую долю лактозы в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С



а)

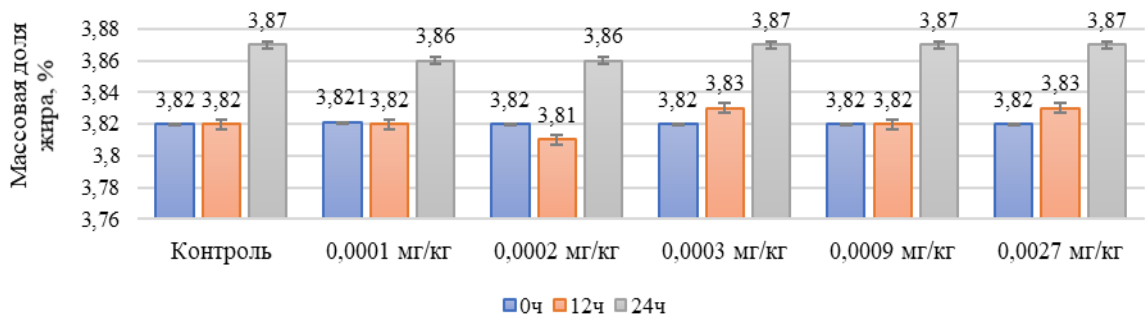


б)

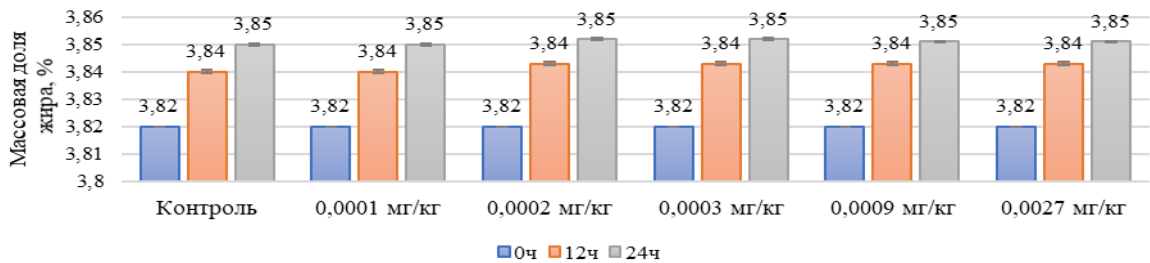


в)

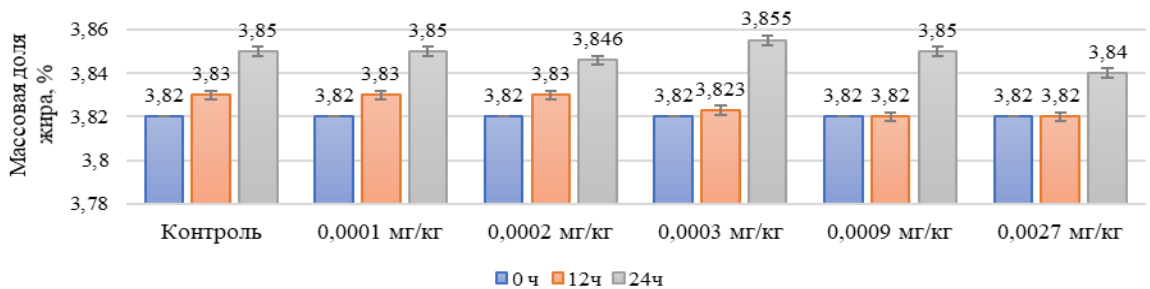
Рисунок 3.2.8 – Влияние флорфеникола на титруемую кислотность в сыром молоке, °Т: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С



а)

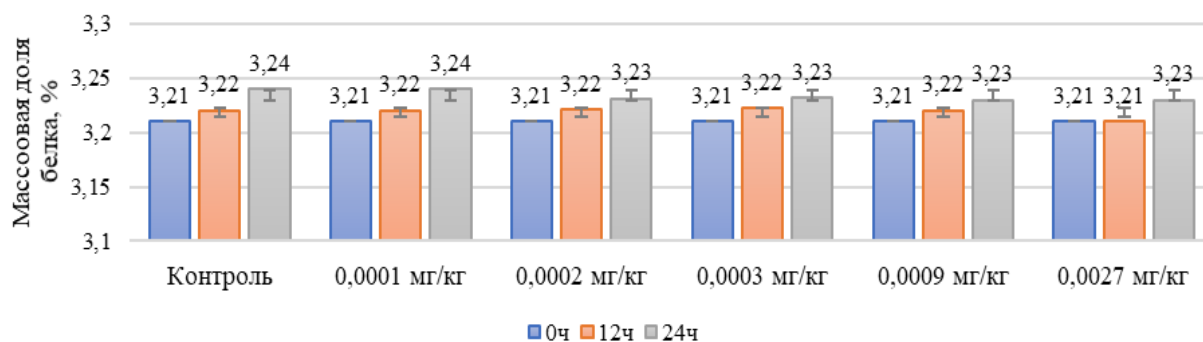


б)

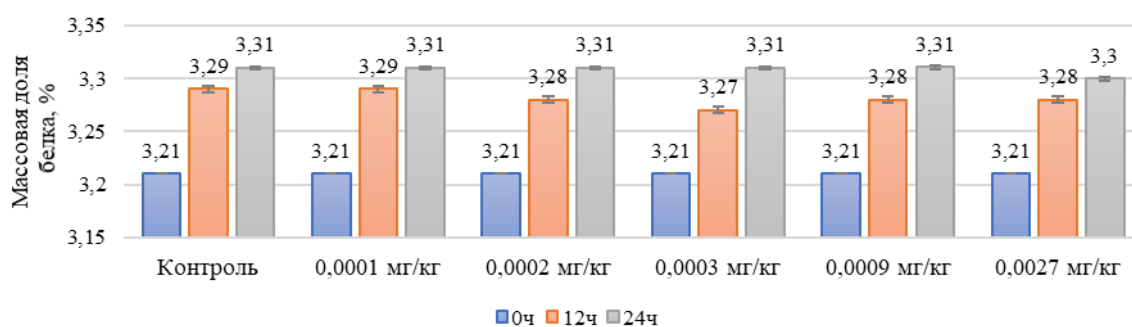


в)

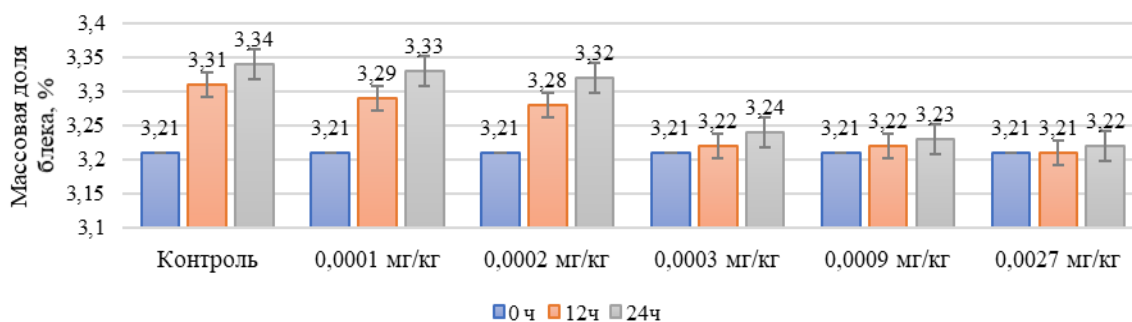
Рисунок 3.2.9 – Влияние флорфеникол амина на массовую долю жира в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С



а)

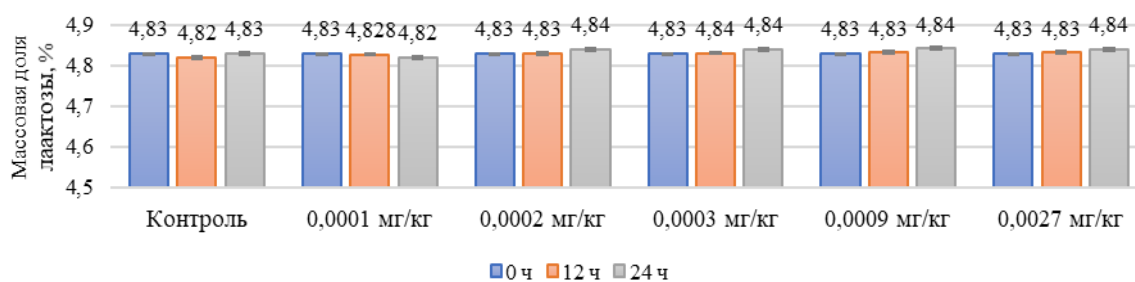


б)

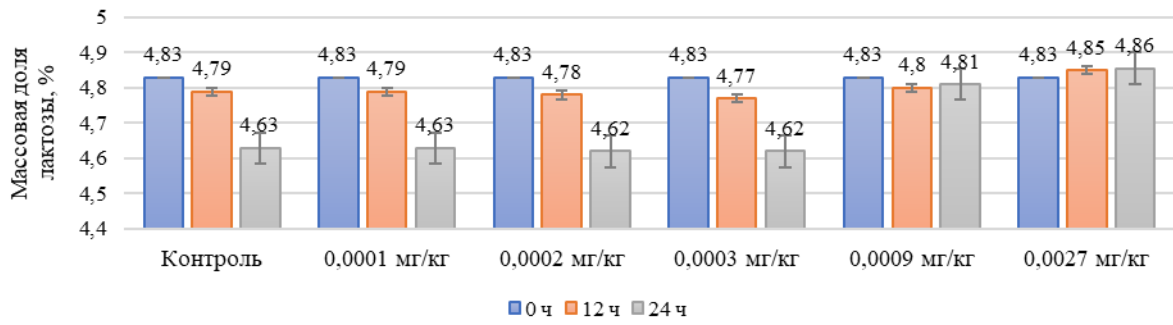


в)

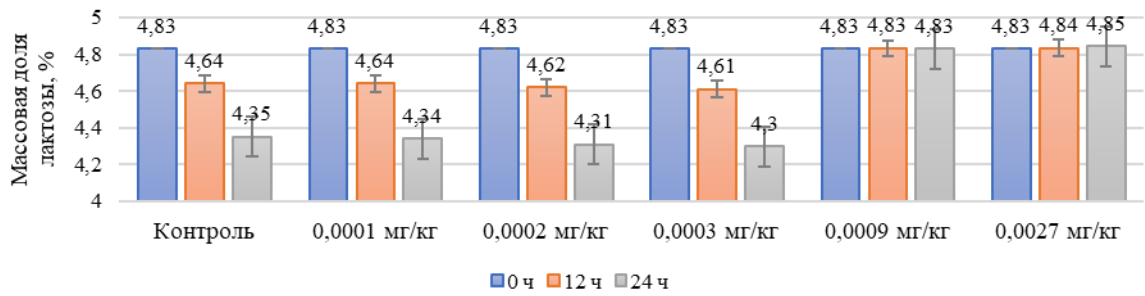
Рисунок 3.2.10 – Влияние флорфеникол амина на массовую долю белка в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С



а)

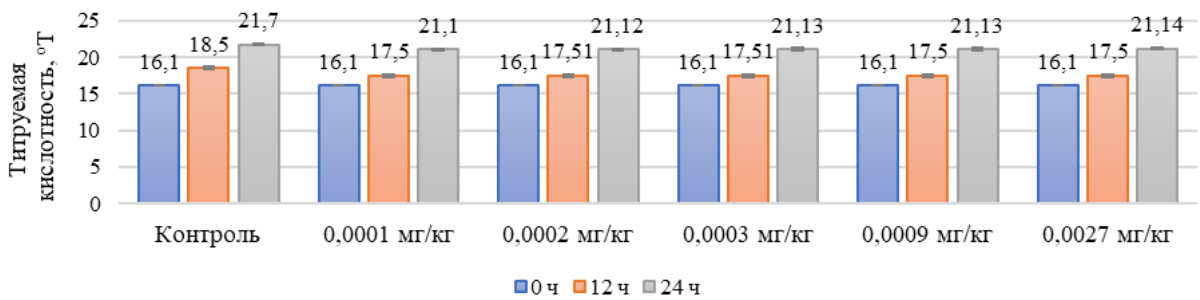


б)

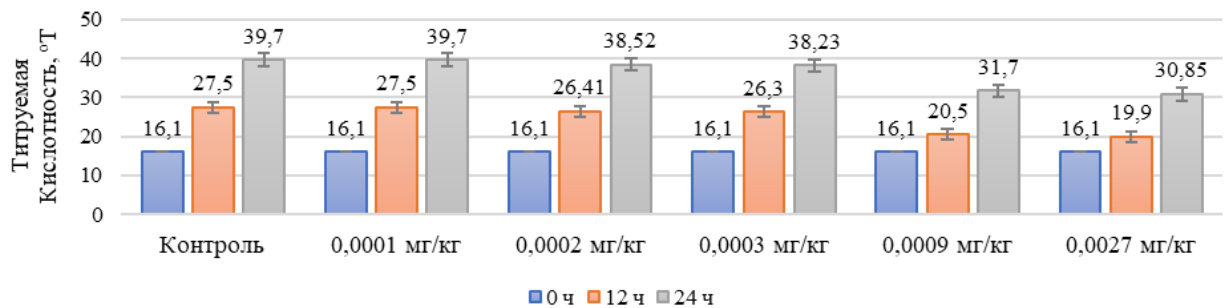


в)

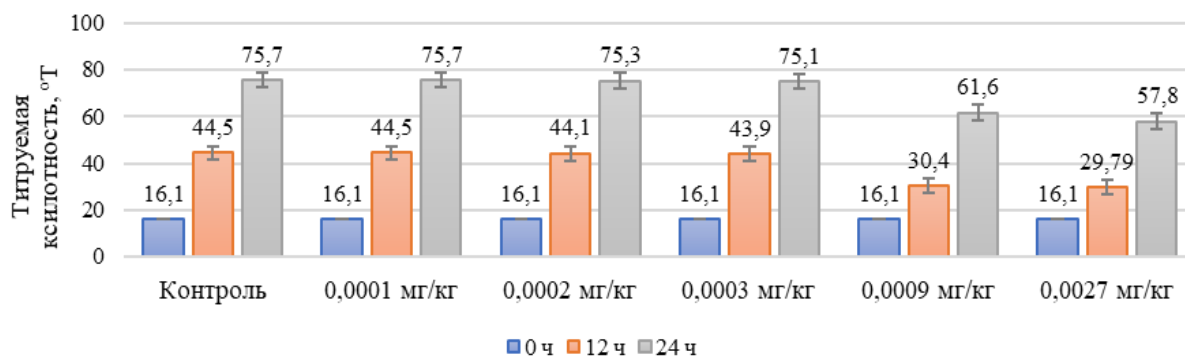
Рисунок 3.2.11 – Влияние флорфеникол амина на массовую долю лактозы в сыром молоке, %: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С



а)



б)



в)

Рисунок 3.2.12 – Влияние флорфеникол амина на титруемую кислотность в сыром молоке, °Т: а) 8 ± 2 °С; б) 25 ± 2 °С; в) 37 ± 2 °С

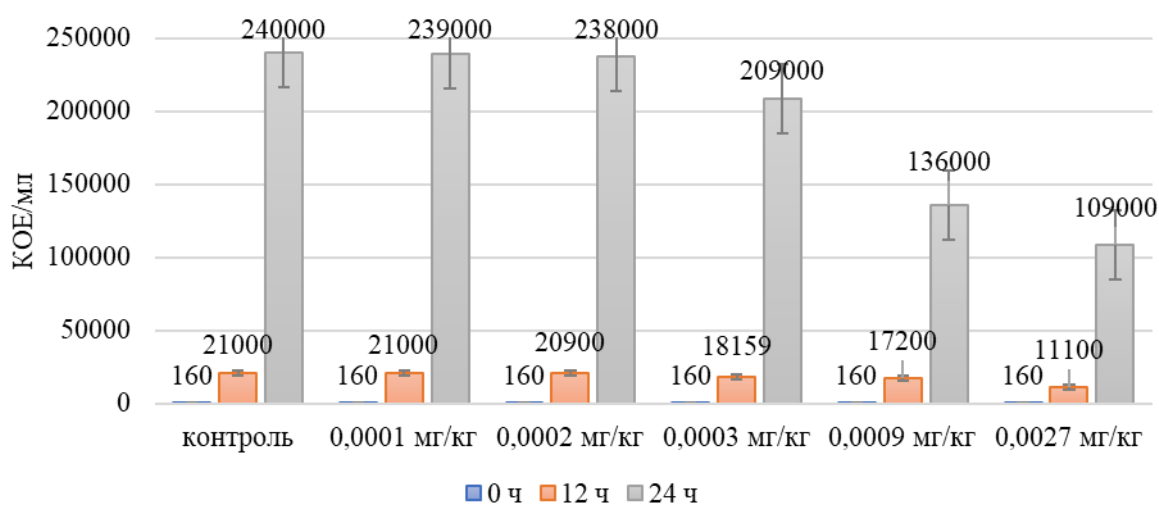
В результате исследования было установлено, что антибиотики группы амфениколы – флорфеникол и флорфеникол амин – проявляют аналогичное влияние на изменения физико-химических свойств молока в заданных условиях. Наиболее выраженное действие присутствие антибиотика в молоке оказало на значения титруемой кислотности при 37 ± 2 °С. В опытном образце с наибольшей концентрацией флорфеникола и флорфеникол амина (0,0027 мг/кг) уровень титруемой кислотности составил 57,8 °Т для каждого, что на 23,6 % меньше исследуемого показателя в контрольном образце молока.

Анализ данных, представленных на рисунках 3.2.1–3.2.12 показал, что в процессе хранения молока в заданных условиях антибиотики группы амфениколы в концентрациях от 0,0001 до 0,0002 мг/кг не оказывали статистически достоверного влияния на исследуемые физико-химические параметры молока.

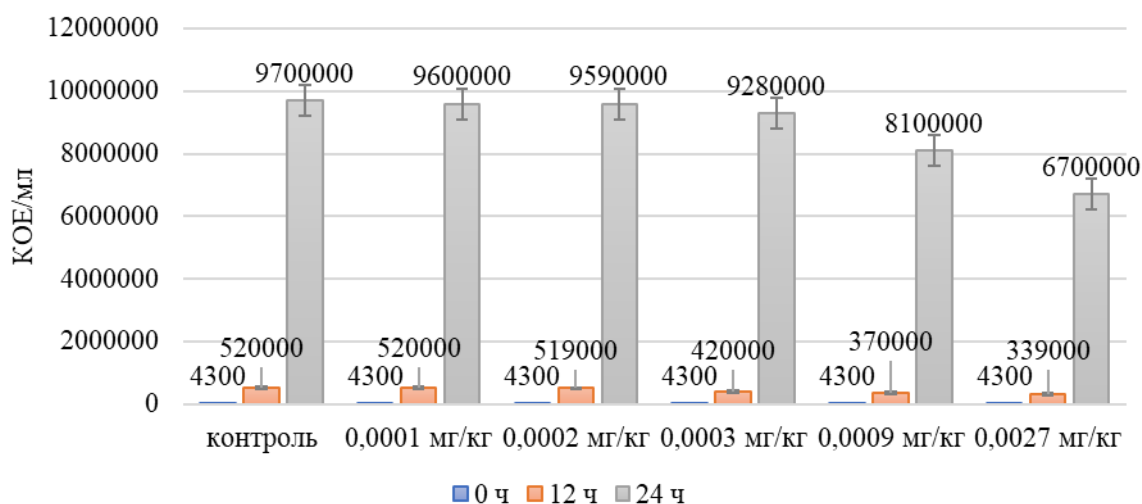
Для изучения дифференциального воздействия антибиотиков группы амфениколов на микрофлору сырого молока установлен характер их влияния при различных температурных режимах (в зависимости от группы исследуемых микроорганизмов) в заданных значениях концентраций. Для проведения анализа микрофлоры сырого молока использовали пластины Petrifilm с последующим подсчётом образующихся колоний микроорганизмов.

Результаты влияния антибиотиков различной концентрации на микрофлору молока, оцененные с помощью анализа на Petrifilm, отражены на рисунках 3.2.13–3.2.15.

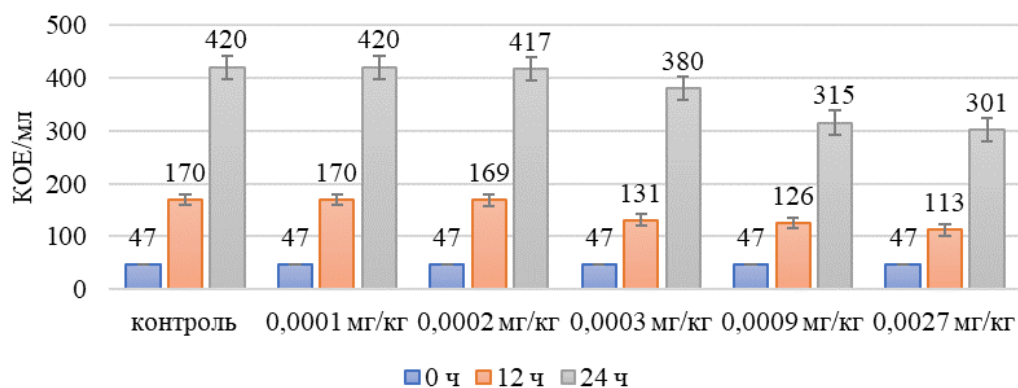
Установлено, что концентрации антибиотиков в пределах от 0,0001 до 0,0002 мг/кг не оказывали статистически достоверного влияния на микрофлору сырого молока. Изменение численности клеток в опытных образцах с концентрациями 0,0001 до 0,0002 мг/кг происходят в том же диапазоне, что и в контрольном образце: с 160 до $24,0 \times 10^4 \pm 0,1$ КОЕ/мл.



а)



б)



в)

Рисунок 3.2.13 – Влияние хлорамфеникола на микрофлору сырого молока:

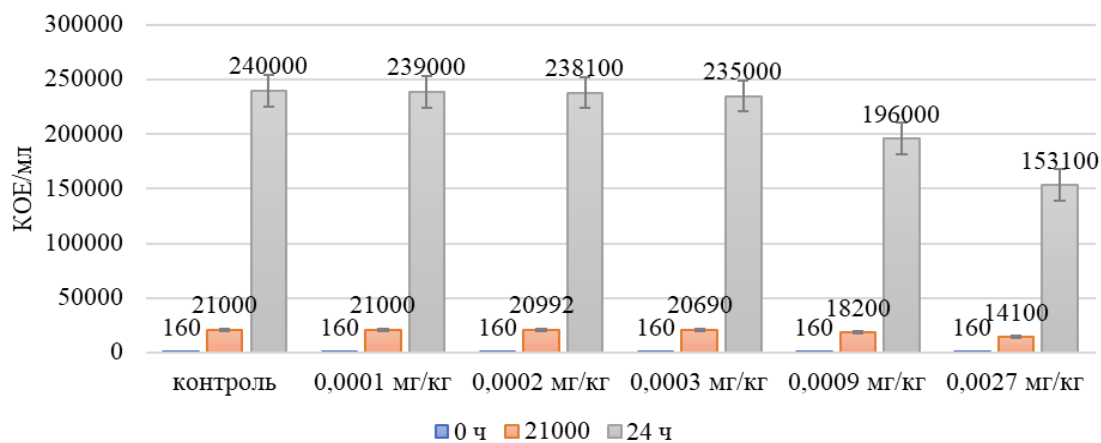
а) молочнокислые бактерии при 35 ± 2 °С; б) КМАФАнМ при 35 ± 2 °С;

в) дрожжи и плесневые грибы при 25 ± 2 °С

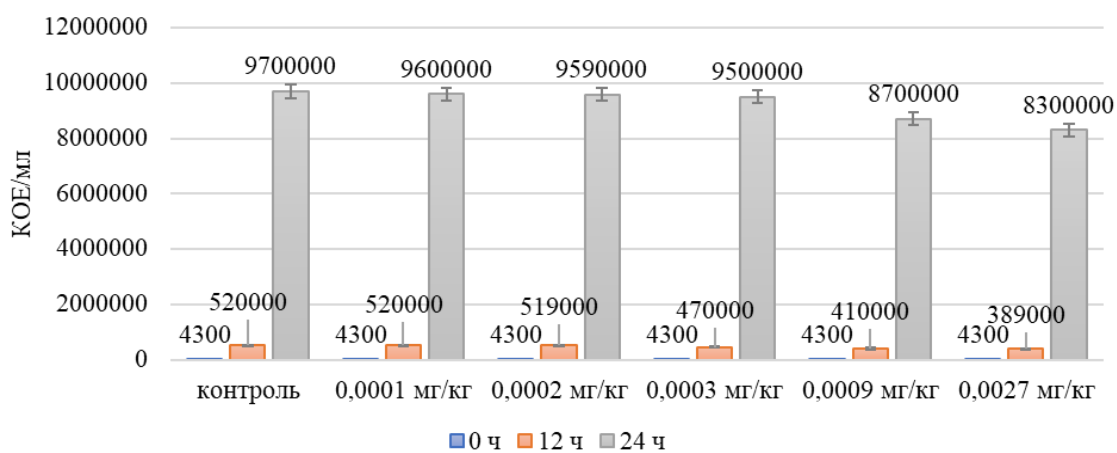
Установлено, что при увеличении концентрации антибиотика в составе сырого молока происходит сокращение количества жизнеспособных клеток микроорганизмов. Наибольшее подавляющее воздействие антибиотик оказал на клетки молочнокислых бактерий и КМАФАнМ. Через 24 ч в образцах с концентрацией 0,0027 мг/кг количество жизнеспособных клеток КМАФАнМ сократилось на 31 % до $7,9 \times 10^6$ КОЕ/мл по сравнению с контрольным образцом. Количество клеток молочнокислых бактерий сократилось до $10,9 \times 10^4$ КОЕ/мл, что на 54,6 % меньше значения контрольного образца.

Увеличение концентрации хлорамфеникола до 0,0003 мг/кг приводит к уменьшению клеток молочнокислых бактерий до $20,9 \times 10^4$ КОЕ/мл, что на 12,2 % меньше результатов для контрольного образца и образцов молока с концентрациями антибиотика 0,0001 и 0,0002 мг/кг.

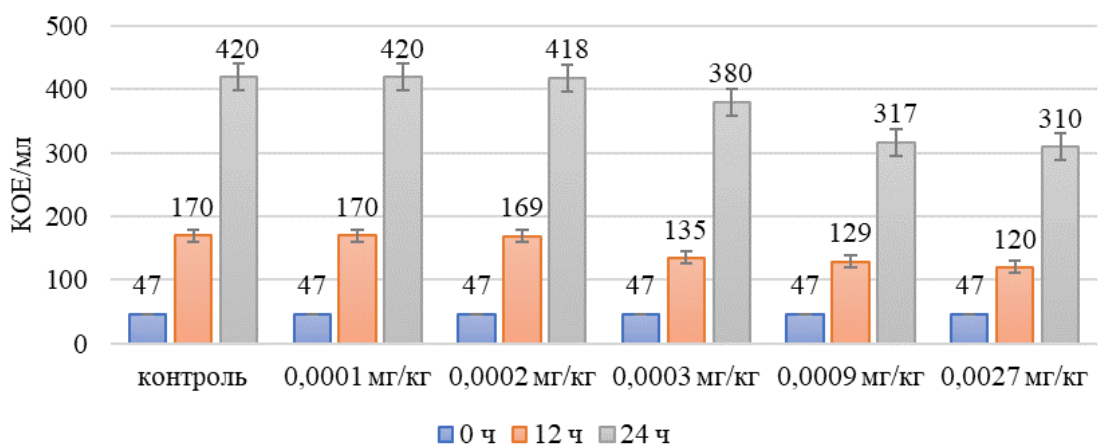
Результаты показали, что исследуемые концентрации антибиотиков флорфеникола и флорфеникол амин оказывают наибольшее подавляющее воздействие на молочнокислые бактерии (рисунки 3.2.13 и 3.2.14). Через 24 ч количество жизнеспособных клеток, по сравнению с контрольным образцом, снижалось на 36,2 % до $15,3 \times 10^4$ КОЕ/мл под воздействием флорфеникола и на 36,7 % до $15,4 \times 10^4$ КОЕ/мл под воздействием флорфеникол амина.



а)



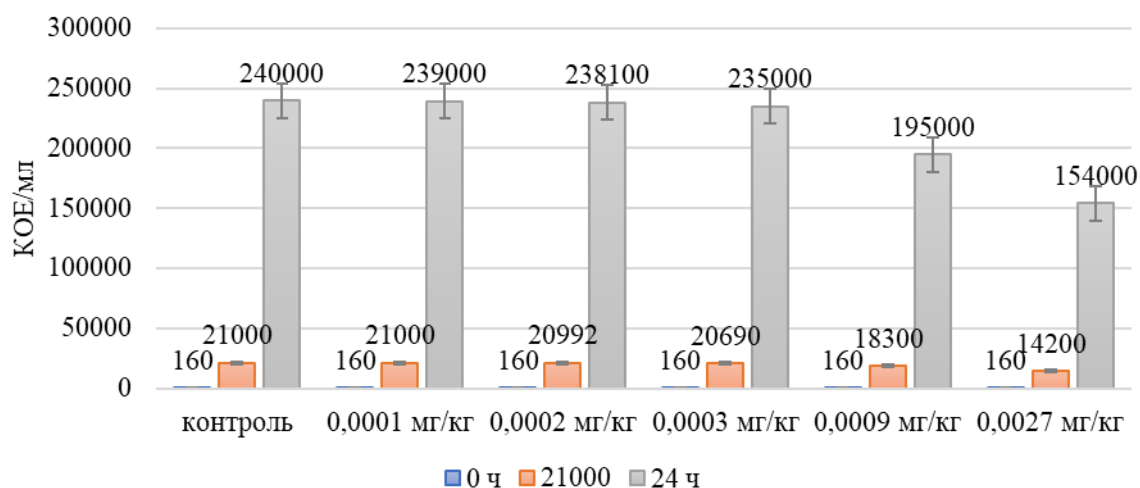
б)



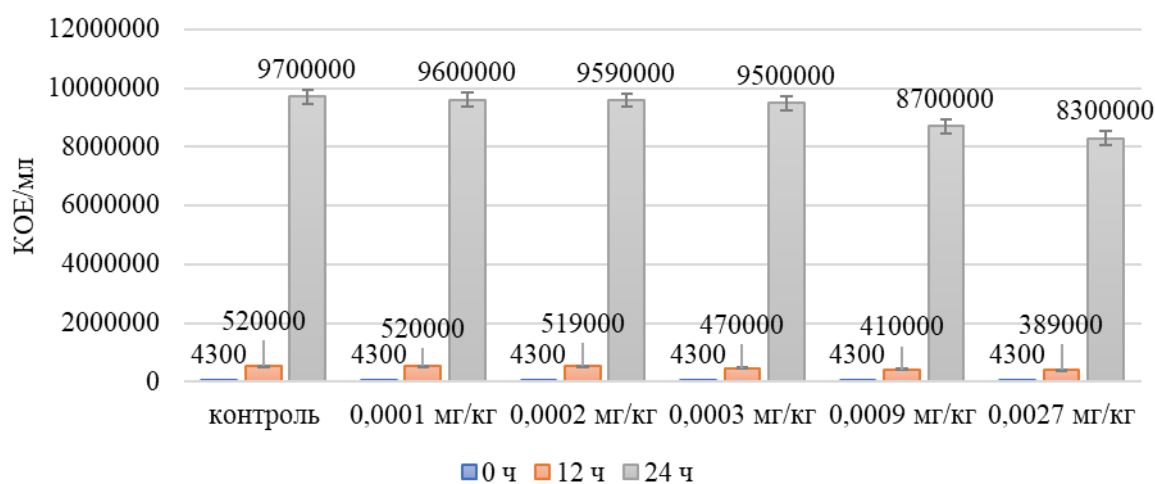
в)

Рисунок 3.2.14 – Влияние флорфеникола на микрофлору сырого молока:

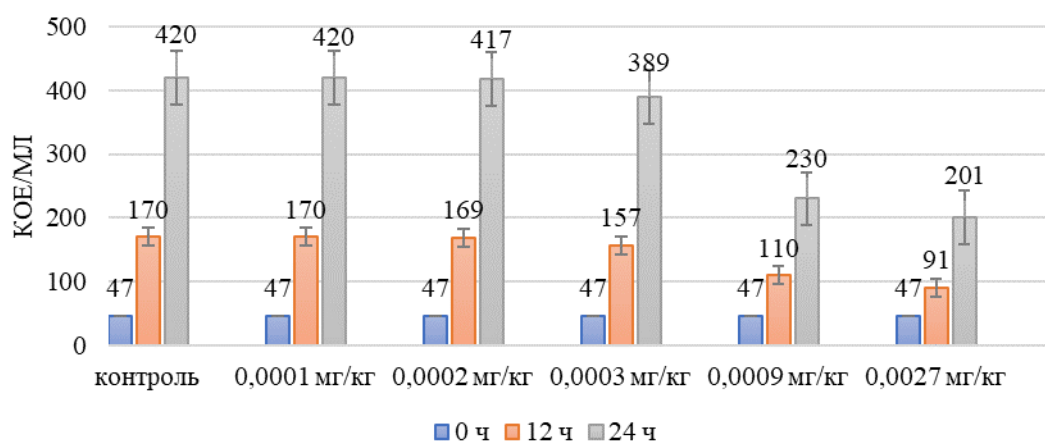
а) молочнокислые бактерии при 35 ± 2 °C; б) КМАФАнМ при 35 ± 2 °C;в) дрожжи и плесневые грибы при 25 ± 2 °C



а)



б)



в)

Рисунок 3.2.15 – Влияние флорфеникол амина на микрофлору сырого молока: а) молочнокислые бактерии при 35 ± 2 °C; б) КМАФАнМ при 35 ± 2 °C; в) дрожжи и плесневые грибы при 25 ± 2 °C

Анализ полученных данных показал, что антибиотики группы амфениколы в разной степени оказывают негативное влияние на развитие микрофлоры сырого молока. Хлорамфеникол проявляет способность ингибировать жизнедеятельность к бактериям группы КМАФАнМ и молочнокислым бактериям, тогда как флорфеникол и флорфеникол амин наиболее эффективны в отношении молочнокислых бактерий. Отмечено, что действие флорфеникола и флорфеникол амина на клетки молочнокислых бактерий ниже в среднем на 30 %, чем действие хлорамфеникола.

На основании полученных результатов для проведения дальнейших исследований в качестве основного ингибирующего антибиотика группы амфениколов в работе рассматривали антибиотик хлорамфеникол.

3.3 Изучение влияния антибиотиков амфениколов на метаболизм молочнокислых бактерий

Факторы, влияющие на чувствительность чистых молочнокислых культур, включают тип культуры и ее состав (монокультура или смешанная), а также тип противомикробного препарата (механизм действия антибиотика на микробную клетку). Большинство проблем, вызванных остатками антибиотиков, связано с тем, что антибиотики частично или полностью подавляют рост молочнокислых бактерий и препятствуют выработке молочной кислоты этими бактериями.

Снижение pH очень важно в процессе приготовления кисломолочных продуктов, например, йогурта, т. к. это повышает активность ферментов и скорость коагуляции. В связи с этим были проведены исследования, направленные на установление характера влияния различных концентраций антибиотика хлорамфеникола в молоке (0,0001, 0,0002, 0,0003, 0,0009 и 0,0027 мг/кг) на заквасочные культуры *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei*.

Результаты влияния амфениколов на молочнокислые бактерии сырого молока отражены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 – Физико-химические показатели молока

| Наименование показателя | Значение показателя |
|----------------------------|---------------------|
| Содержание белка, % | 3,12±0,01 |
| Содержание жира, % | 1,60±0,01 |
| Содержание лактозы, % | 4,21±0,02 |
| Содержание СОМО, % | 8,90±0,03 |
| Кислотность, °Т | 17,01±0,03 |
| Температура замерзания, °С | 0,48±0,02 |

Для проведения исследования были приготовленные маточные закваски чистых культур промышленных штаммов молочнокислых бактерий: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei*, которые вносили в исходное молоко. Процесс ферментации проводили при 40±2 °С до образования прочного сгустка кислотностью 95–100 °Т контрольного образца.

В таблицах 3.3.2–3.3.4 представлены результаты влияние хлорамфеникола на основные показатели качества заквасочных культур.

Таблица 3.3.2 – Влияние хлорамфеникола на свойства закваски *Streptococcus thermophilus*

| Параметр | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | | |
|--|----------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003* | 0,0009 | 0,0027 |
| Продолжительность образования сгустка, ч | 4,50±0,10 | 4,80±0,10 | 4,91±0,10 | 11,00±0,30 | – | – |
| Численность микроорганизмов, КОЕ/мл | 5,10×10 ⁶ | 3,60×10 ⁵ | 2,90×10 ⁵ | 6,10×10 ⁴ | 7,10×10 ³ | 2,40×10 ³ |
| Содержание жира, % | 0,51±0,01 | 0,50±0,01 | 0,50±0,01 | 0,48±0,01 | 0,48±0,01 | 0,47±0,01 |
| Содержание белка, % | 2,98±0,02 | 2,98±0,02 | 2,91±0,02 | 2,94±0,01 | 2,93±0,01 | 2,93±0,01 |

Продолжение таблицы 3.3.2

| Параметр | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | | |
|-----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003* | 0,0009 | 0,0027 |
| Содержание лактозы, % | 3,52±0,01 | 3,52±0,01 | 3,41±0,01 | 3,98±0,01 | 4,11±0,01 | 4,20±0,01 |
| Содержание СОМО, % | 6,18±0,02 | 6,24±0,02 | 6,24±0,02 | 6,25±0,02 | 6,31±0,02 | 6,51±0,02 |
| Кислотность, °Т | 110,00± 1,00 | 110,00± 2,00 | 109,00± 2,00 | 90,00± 1,00 | 81,00± 2,00 | 73,00± 1,00 |

Здесь и далее «*» – показатель ПДК хлорамфеникола согласно ТР ТС 033/2013 [118]

Таблица 3.3.3 – Влияние хлорамфеникола на свойства закваски *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

| Параметр | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | | |
|--|----------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003 * | 0,0009 | 0,0027 |
| Продолжительность образования сгустка, ч | 4,50±0,10 | 4,61±0,10 | 4,88±0,10 | 13,60±0,10 | – | – |
| Численность микроорганизмов, КОЕ/мл | 5,10×10 ⁶ | 5,10×10 ⁶ | 4,91×10 ⁶ | 3,10×10 ⁵ | 8,11×10 ⁴ | 2,70×10 ⁴ |
| Содержание жира, % | 0,51±0,01 | 0,50±0,01 | 0,50±0,01 | 0,48±0,01 | 0,48±0,01 | 0,47±0,01 |
| Содержание белка, % | 2,98±0,02 | 2,98±0,02 | 2,96±0,02 | 2,94±0,01 | 2,93±0,01 | 2,93±0,01 |
| Содержание лактозы, % | 3,52±0,01 | 3,52±0,01 | 3,43±0,01 | 3,87±0,01 | 4,10±0,01 | 4,20±0,01 |
| Содержание СОМО, % | 6,18±0,02 | 6,25±0,02 | 6,25±0,02 | 6,27±0,02 | 6,29±0,01 | 6,42±0,01 |
| Кислотность, °Т | 110,00± 1,00 | 110,00± 2,00 | 110,00± 2,00 | 91,00± 1,00 | 83,00± 2,00 | 74,00± 1,00 |

Таблица 3.3.4 – Влияние хлорамфеникола на свойства закваски *Lactobacillus casei*

| Параметр | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | | |
|--|-----------|---------------------------------|-----------|-----------------|--------|--------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003 * | 0,0009 | 0,0027 |
| Продолжительность образования сгустка, ч | 4,50±0,10 | 4,51±0,10 | 4,88±0,10 | 14,01±0,10 | – | – |

Продолжение таблицы 3.3.4

| Параметр | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | | |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003 * | 0,0009 | 0,0027 |
| Численность микроорганизмов, КОЕ/мл | $5,10 \times 10^6$ | $5,10 \times 10^6$ | $4,91 \times 10^6$ | $2,90 \times 10^5$ | $7,91 \times 10^4$ | $3,11 \times 10^4$ |
| Содержание жира, % | $0,51 \pm 0,01$ | $0,50 \pm 0,01$ | $0,50 \pm 0,01$ | $0,48 \pm 0,01$ | $0,48 \pm 0,01$ | $0,47 \pm 0,01$ |
| Содержание белка, % | $2,98 \pm 0,02$ | $2,98 \pm 0,02$ | $2,96 \pm 0,02$ | $2,94 \pm 0,01$ | $2,93 \pm 0,01$ | $2,93 \pm 0,01$ |
| Содержание лактозы, % | $3,52 \pm 0,01$ | $3,51 \pm 0,01$ | $3,51 \pm 0,01$ | $3,91 \pm 0,01$ | $4,09 \pm 0,01$ | $4,20 \pm 0,01$ |
| Содержание СОМО, % | $6,18 \pm 0,02$ | $6,25 \pm 0,02$ | $6,25 \pm 0,02$ | $6,27 \pm 0,02$ | $6,29 \pm 0,01$ | $6,42 \pm 0,01$ |
| Кислотность, °Т | $110,00 \pm 1,00$ | $109,00 \pm 2,00$ | $109,00 \pm 2,00$ | $94,00 \pm 1,00$ | $88,00 \pm 2,00$ | $80,00 \pm 1,00$ |

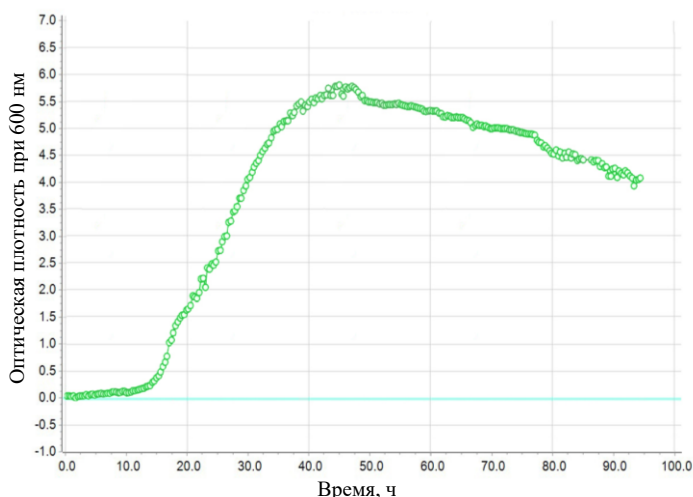
Установлено, что с увеличением значения концентрации антибиотика 0,0003 мг/кг и более происходит снижение значений титруемой кислотности. Значение рассматриваемого параметра в контрольном образце составило $110,00 \pm 1,00$ °Т, а в опытных образцах с наибольшей концентрацией антибиотика (0,0027 мг/кг) для *Streptococcus thermophilus* – $79,00 \pm 1,00$ °Т, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* – $77,00 \pm 1,00$ °Т, *Lactobacillus casei* – $80,00 \pm 1,00$ °Т, что в среднем на $30 \pm 0,1$ % ниже, чем в контрольном образце.

Концентрации антибиотика 0,0003 мг/кг и более оказали влияние на содержание лактозы. В контрольном и опытных образцах с концентрацией антибиотика 0,0001 и 0,0002 мг/кг среднее содержание лактозы для всех исследуемых штаммов составило $3,52 \pm 0,01$ %, а с увеличением концентрации до 0,0003 мг/кг значение лактозы увеличилось до $3,98 \pm 0,01$ % для *Streptococcus thermophilus*, до $3,87 \pm 0,01$ % для *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и до $3,91 \pm 0,01$ % для *Lactobacillus casei*. В исходном молоке содержание лактозы составило $4,21 \pm 0,02$ % (таблица 3.3.1).

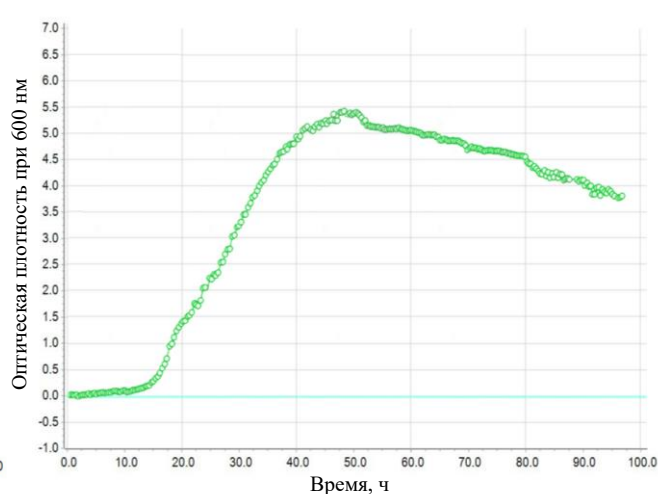
В контрольном образце время обрезания сгустка составило $4,50 \pm 0,10$ ч, а в опытных образцах с концентрацией антибиотика 0,0003 мг/кг наблюдалось увеличение значений данного показателя для *Streptococcus thermophilus* – $11,00 \pm 0,30$ ч,

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus – $13,00 \pm 0,30$ ч, *Lactobacillus casei* – $14,00 \pm 0,30$ ч. При больших значениях антибиотика образование сгустка не наблюдалось.

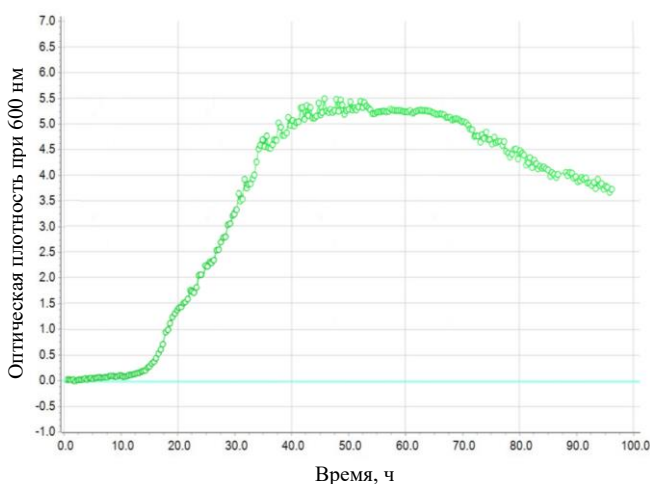
Результаты влияния исследуемых концентраций антибиотика на кинетику роста и развитие заквасочных культур *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei* при температуре инкубации 37 ± 2 °С показали, что концентрация антибиотика хлорамфеникола $0,0003$ мг/кг и более оказывает ингибирующее действие на заквасочные культуры в сравнении с контрольным и опытными образцами с концентрациями антибиотика $0,0001$ и $0,0002$ мг/кг. На рисунках 3.3.1–3.3.3 отражено влияние антибиотика на изучаемые молочнокислые бактерии.



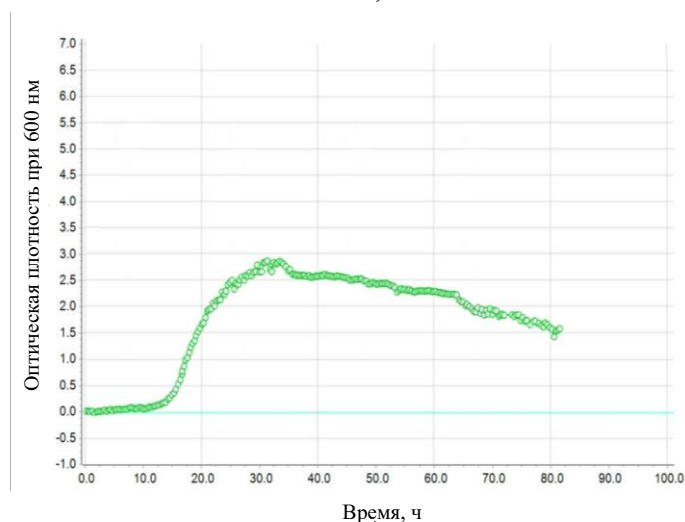
а)



б)



в)



г)

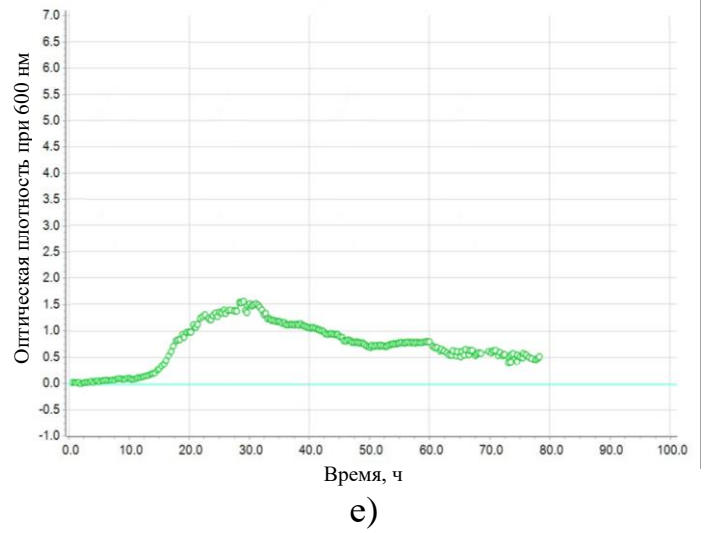
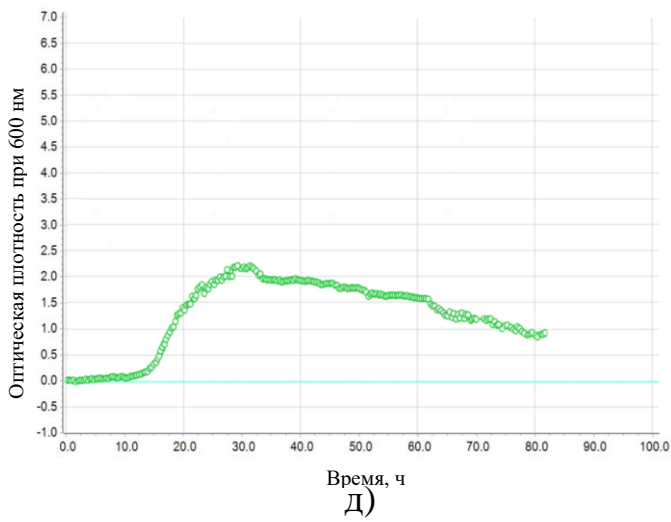
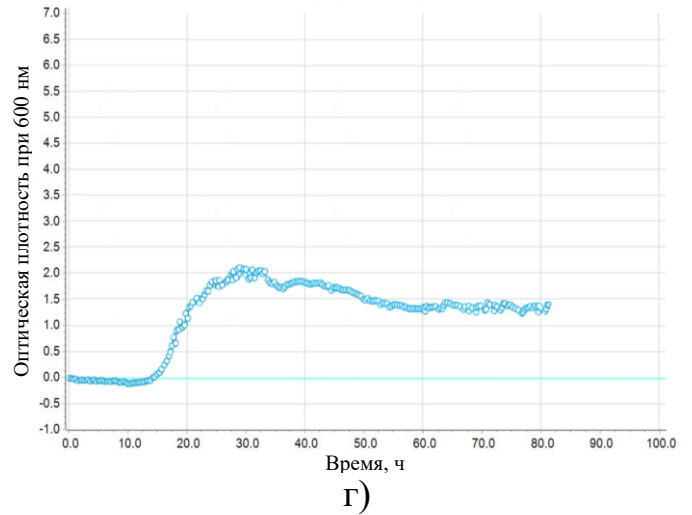
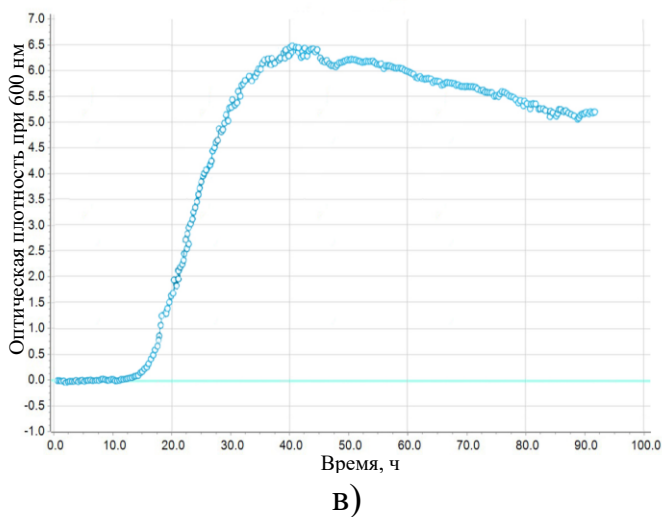
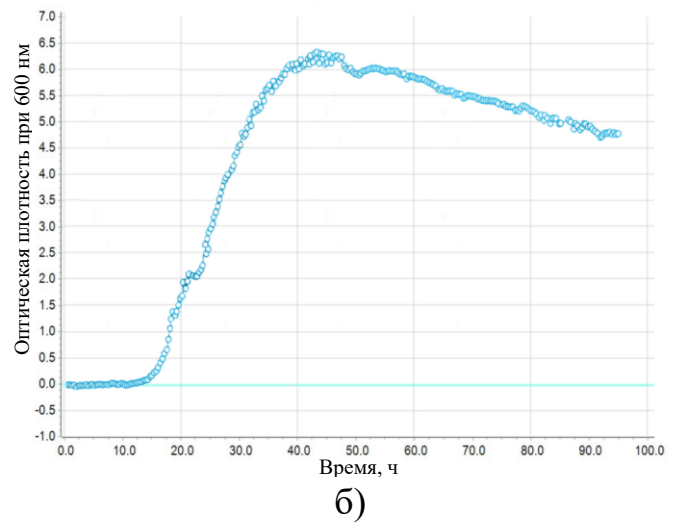
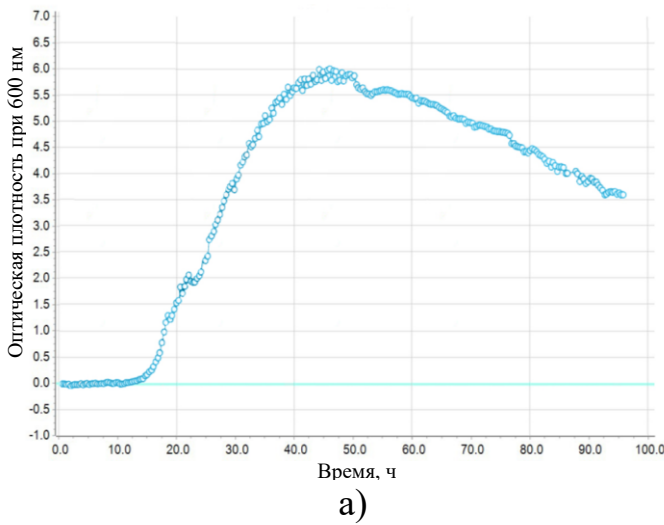
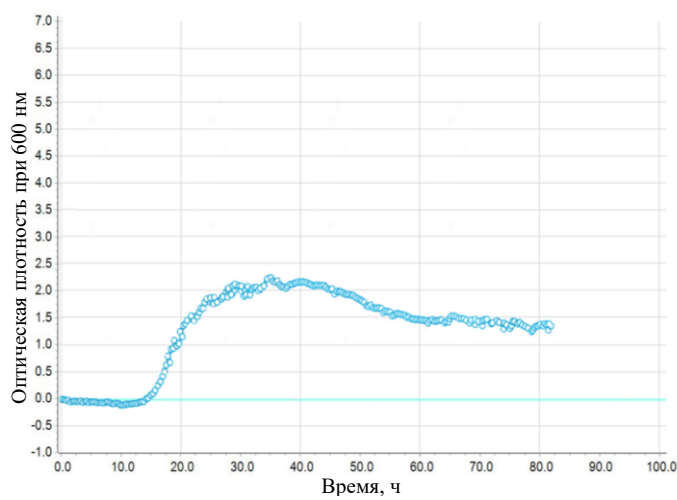
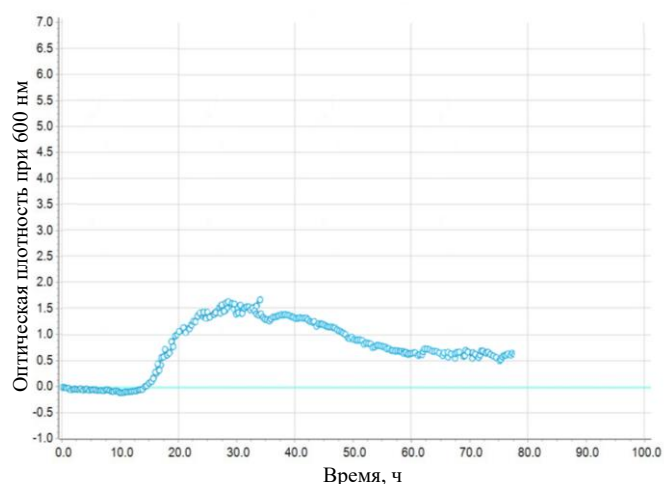


Рисунок 3.3.1 – Динамика развития *Streptococcus thermophilus* в присутствии хлорамфеникола ($t = 37 \pm 2$ °C): а) контроль; б) 0,0001 мг/кг; в) 0,0002 мг/кг; г) 0,0003 мг/кг; д) 0,0009 мг/кг; е) 0,0027 мг/кг



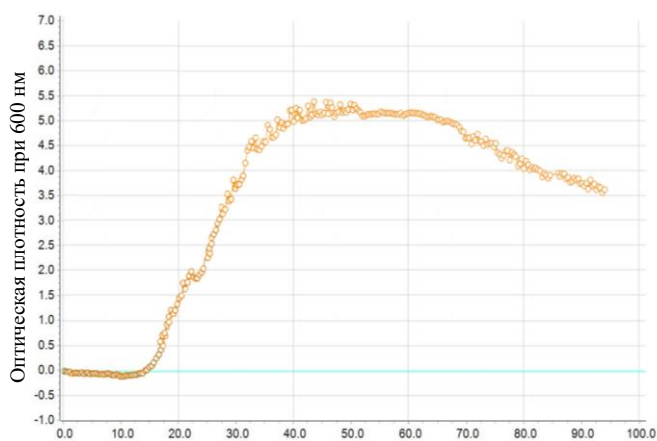


д)

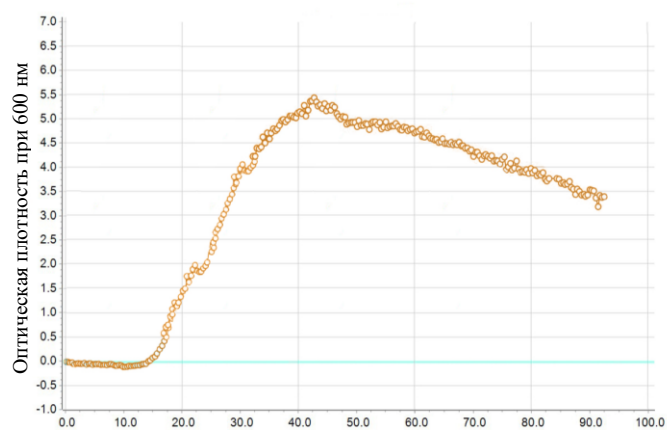


е)

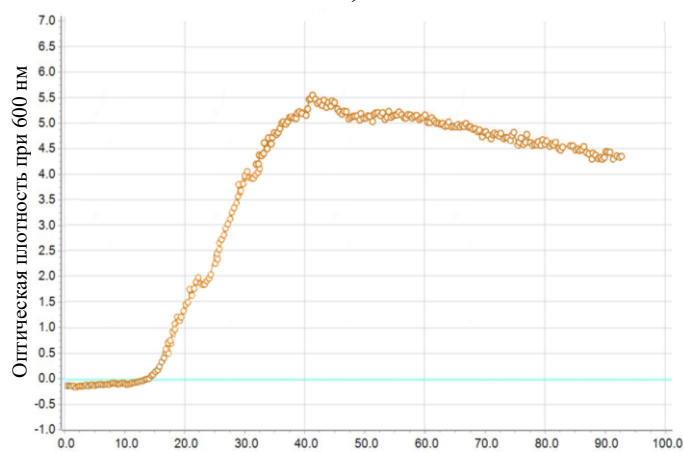
Рисунок 3.3.2 – Динамика развития *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* в присутствии хлорамфеникола ($t = 37 \pm 2$ °C): а) контроль; б) 0,0001 мг/кг; в) 0,0002 мг/кг; г) 0,0003 мг/кг; д) 0,0009 мг/кг; е) 0,0027 мг/кг



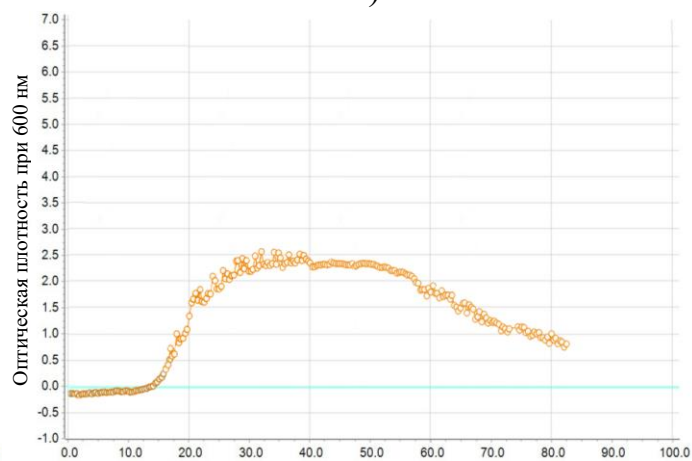
а)



б)



в)



г)

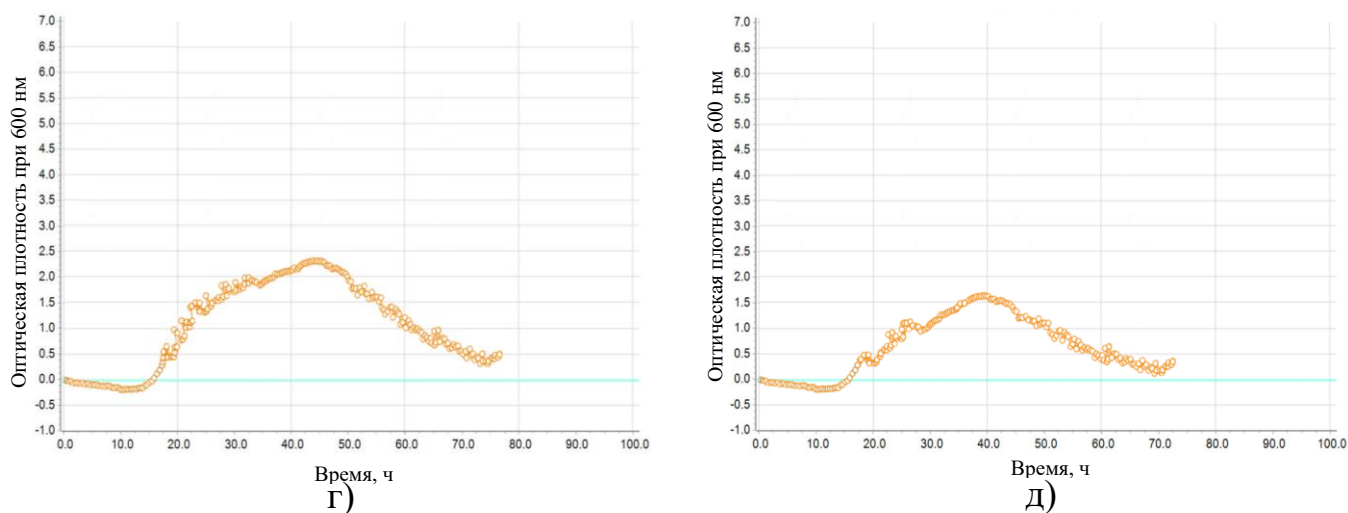


Рисунок 3.3.3 – Динамика развития *Lactobacillus casei* в присутствии хлорамфеникола ($t = 37 \pm 2$ °C): а) контроль; б) 0,0001 мг/кг; в) 0,0002 мг/кг; г) 0,0003 мг/кг; д) 0,0009 мг/кг; е) 0,0027 мг/кг

Результаты оценки профиля органических кислот на 4–6 ч ферментации молочнокислых бактерий в присутствии антибиотика различной концентрации представлены в таблице 3.3.5.

Таблица 3.3.5 – Концентрация органических кислот в конце ферментации

| Культура | Контроль | Концентрация хлорамфеникола, мг/кг | | | | |
|--|------------------|------------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0027 |
| Молочная кислота | | | | | | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 1104,96 ±2,90 | 1100,66 ±5,40 | 1088,14 ±1,41 | 810,16 ±1,10 | 151,12 ±1,21 | 48,32 ±3,40 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | 1269,43 ±6,40 | 1201,88 ±1,90 | 1191,88 ±1,90 | 852,18 ± 3,30 | 203,99 ±5,01 | 56,11 ±5,31 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 1166,41 ±3,41 | 1151,42 ±3,80 | 1151,42 ±3,81 | 871,11 ±3,22 | 176,99 ±4,01 | 51,11 ± 3,31 |
| Пировиноградная кислота | | | | | | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 3,42±0,81 | 3,41 ±0,31 | 3,39±0,31 | 1,27±0,10 | 0,84±0,21 | – |

Продолжение таблицы 3.3.5

| Культура | Контроль | Концентрация хлорамфеникола, мг/кг | | | | |
|--|-----------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 0,0001 | 0,0002 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0027 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | 3,67±0,31 | 3,59±0,22 | 3,51±0,11 | 1,83±0,32 | 0,78±0,42 | – |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 3,44±0,31 | 3,40±0,21 | 3,39±0,11 | 1,67±0,31 | 0,61±0,42 | – |
| Уксусная кислота | | | | | | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 9,21±0,30 | 9,94±0,51 | 9,84±0,50 | 9,15±0,30 | 8,87±0,30 | 8,87±0,31 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> | 10,05±0,11 | 9,55±0,21 | 9,24±0,20 | 8,84±1,10 | 8,75±0,30 | 8,75±0,31 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 9,89±0,10 | 9,75±0,21 | 9,27±0,21 | 8,9±1,10 | 8,87±0,30 | 8,70±0,32 |
| Муравьиная кислота | | | | | | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 17,60±1,10 | 17,67 ±0,80 | 17,67 ±0,80 | 17,82 ±0,81 | 17,98 ±0,51 | 17,92 ±1,30 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> | 17,06±1,50 | 17,15 ±0,31 | 17,11 ±0,30 | 17,18 ±1,01 | 17,25 ±0,51 | 17,31 ±0,10 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 17,54±1,10 | 17,21 ±0,30 | 17,21 ±0,21 | 17,31 ±1,01 | 17,99 ±0,51 | 18,01 ±0,10 |
| Лимонная кислота | | | | | | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 145,03 ±1,11 | 142,91 ±0,20 | 142,91 ±0,20 | 147,95 ±2,11 | 143,22 ±1,21 | 147,08 ±1,10 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> | 145,45 ±1,11 | 141,10 ±1,20 | 141,10 ±1,20 | 145,12±1, 11 | 144,12 ±1,61 | 145,51 ±1,10 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 140,48 ±1,21 | 141,10 ±1,20 | 143,10 ±1,50 | 148,17 ±1,11 | 146,12 ±1,61 | 151,51 ±1,10 |

Основным продуктом метаболизма молочнокислых бактерий является молочная кислота, что подтверждается ее высокими концентрациями в контрольных образцах в конце ферментации. Статистически значимое влияние ($p < 0,05$) на

концентрацию молочной кислоты обнаружено для образцов, содержащих антибиотик хлорамфеникол. Установлено, что присутствие антибиотика в молоке с концентрацией 0,0003 мг/кг снижает концентрацию молочной кислоты для *Streptococcus thermophilu* на 95,47 %, на 95,57 % для *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и на 95,61 % для *Lactobacillus casei* по сравнению с контрольным образцом.

Снижение концентрации в исследуемых образцах пировиноградной кислоты указывает на ингибирование жизнедеятельности молочнокислых культур исследуемой группой антибиотиков. Наиболее значительное влияние на образование пировиноградной кислоты наблюдался в образцах, содержащих хлорамфеникол концентрацией 0,0027 мг/кг, где концентрации пировиноградной кислоты в конце ферментации были ниже предела обнаружения. Это свидетельствует об отсутствии образования кислоты в исследуемых образцах.

Результаты, полученные в результате исследования, свидетельствуют о том, что антибиотик группы амфениколы – хлорамфеникол – оказывает ингибирующее влияние на заквасочные культуры молочнокислых микроорганизмов. Его присутствие в молоке с концентрацией в значениях ПДК 0,0003 мг/кг, согласно ТР ТС 033/2013 [118], приводит к снижению титруемой кислотности, влияет на продолжительность образования сгустка и оказывает влияние на кинетику роста рассматриваемых бактерий.

3.4 Определение влияния антибиотика на качество и безопасность кисломолочных продуктов

Наличие остатков хлорамфеникола в молоке, предназначенном для производства кисломолочных продуктов, как было установлено ранее, влияет на рост заквасочных культур, на свертывание молока и титруемую кислотность. Все эти изменения негативно влияют не только на технологические процессы, вызывая снижение качества готовой продукции, но и на экономические последствия для молочной отрасли.

Проведены исследования по установлению влияния хлорамфеникола на качество и безопасность кисломолочных продуктов. Результаты оценки органолептических свойств готового продукта – йогурта, изготовленного из молока с добавлением антибиотика различной концентрации, – отражены в таблице 3.4.1. В качестве закваски использовали йогуртовую закваску БАКЗДРАВ, состоящую из заквасочных культур *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei*.

Йогурт изготавливали в соответствии с ГОСТ 31981-2013 [43]. Закваску вносили в количестве 3 г на 1 л заквашиваемого молока. Процесс ферментации осуществляли при 40 ± 2 °С в термостатной камере в течение 4 ± 2 ч. Конец ферментации определяли по достижении титруемой кислотности 95 ± 3 °Т и образованию сгустка в контрольном образце.

На основании данных, представленных в таблице 3.4.1, было установлено, что наличие хлорамфеникола в исходном сырье с концентрацией 0,0003 мг/кг и более оказывает влияние на органолептические показатели йогурта. С увеличением его концентрации консистенция становилась неоднородной, прослеживалось расслоение густой и жидкой фаз с нарушенным хлопьевидным сгустком. Отмечено появление постороннего привкуса и запаха, а также изменение цвета. Анализ результатов позволил сделать вывод о том, что опытные образцы с концентрациями антибиотика 0,0003 мг/кг и более не соответствуют органолептическим показателям качества согласно требованиям ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия» [43].

Изменение физико-химических показателей йогурта под воздействием антибиотика хлорамфеникола представлено в таблице 3.4.2.

Результаты показали, что с увеличением значения концентрации антибиотика 0,0003 мг/кг и более происходит снижение титруемой кислотности. Значение рассматриваемого параметра в контрольном образце составило $121,2 \pm 1,10$ °Т, а в опытном образце с концентрацией антибиотика 0,0003 мг/кг – $101,1 \pm 1,10$ °Т, что в среднем на $27 \pm 0,1$ % ниже, чем в контрольном и опытном образцах с концентрацией антибиотика 0,0001 мг/кг.

Таблица 3.4.1 – Органолептические показатели йогурта, изготовленного из молока с различной концентрацией антибиотика

| Показатель | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | | |
|---------------------------|--|--|--|---|--|
| | Контроль | 0,0001 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0027 |
| Вкус и запах | Кисломолочный, без посторонних запахов | Кисломолочный, без посторонних запахов | Кисломолочный, без посторонних запахов | Слабо выраженный кисломолочный вкус, присутствие постороннего запаха | Слабо выраженный кисломолочный вкус, присутствие постороннего запаха |
| Внешний вид, консистенция | Однородная, в меру вязкая | Однородная, в меру вязкая | Неоднородная, прослеживается расслоение густой и жидкой фаз, без включений | Неоднородная, прослеживается расслоение густой и жидкой фаз, с образованием хлопьев | Неоднородная, прослеживается расслоение густой и жидкой фаз с образованием хлопьев |
| Цвет | Молочно-белый, равномерный по всей массе | Молочно-белый, равномерный по всей массе | Молочно-белый, неравномерный по всей массе | Молочно-белый, неравномерный по всей массе | Молочно-белый, неравномерный по всей массе |

Таблица 3.4.2 – Физико-химические показатели йогурта

| Показатель | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | |
|-----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | | 0,0001 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0027 |
| Содержание жира, % | 3,84± 0,01 | 3,83± 0,01 | 3,79± 0,01 | 3,76± 0,01 | 3,76± 0,01 |
| Содержание белка, % | 3,31± 0,02 | 3,32± 0,03 | 3,33± 0,02 | 3,28± 0,02 | 3,30± 0,02 |
| Содержание лактозы, % | 3,41± 0,01 | 3,42± 0,02 | 3,91± 0,01 | 4,09± 0,01 | 4,20± 0,01 |
| Содержание СОМО, % | 14,02± 0,01 | 13,11± 0,01 | 13,01± 0,02 | 12,87± 0,01 | 11,04± 0,02 |
| Кислотность, °Т | 121,20± 1,10 | 120,40± 1,00 | 101,10± 1,10 | 89,10± 2,20 | 73,10± 1,10 |

Концентрация антибиотика 0,0003 мг/кг и более оказала влияние на содержание лактозы в готовом продукте. В контрольном и опытных образцах с концентрацией антибиотика 0,0001 среднее содержание лактозы для всех исследуемых штаммов составило $3,41 \pm 0,02$ %, а с увеличением концентрации до 0,0003 мг/кг значение лактозы составило $3,91 \pm 0,01$ %.

Микробиологические показатели йогурта под воздействием антибиотика хлорамфеникола представлены в таблице 3.4.3.

Таблица 3.4.3 – Микробиологические показатели йогурта

| Показатель | Контроль | Концентрация антибиотика, мг/кг | | | |
|---|-------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 0,0001 | 0,0003 | 0,0009 | 0,0027 |
| Молочнокислые бактерии, КОЕ/мл | $4,1 \times 10^8$ | $4,1 \times 10^8$ | $4,5 \times 10^7$ | $5,1 \times 10^6$ | $3,4 \times 10^5$ |
| Дрожжи и плесневые грибы, КОЕ/мл | – | – | – | – | – |
| КМАФАнМ, КОЕ/мл | $3,4 \times 10^3$ | $2,8 \times 10^3$ | – | – | – |
| БГКП (колиформы) | – | – | – | – | – |
| Стафилококки <i>Staphylococcus aureus</i> | – | – | – | – | – |
| Патогенные, в т. ч. сальмонеллы | – | – | – | – | – |

Полученные результаты показали, что антибиотик хлорамфеникол повлиял на снижение общей бактериальной обсемененности с $3,4 \times 10^3$ КОЕ/мл до полного подавления роста в опытном образце с концентрацией антибиотика 0,0003 мг/кг. Отмечено снижение количества молочнокислых бактерий с $4,1 \times 10^8$ до $4,5 \times 10^7$ КОЕ/мл в опытном образце с концентрацией 0,0003 мг/кг и до $3,4 \times 10^5$ КОЕ/мл в опытном образце с наибольшей концентрацией.

Проведенные исследования показали, что присутствие антибиотика в молоке, даже в концентрациях в пределах ПДК – 0,0003 мг/кг, оказывает влияние на качество и безопасность молочной продукции. Присутствие антибиотика в молоке оказало влияние на физико-химические, микробиологические и органолептические показатели йогурта. Таким образом, полученные опытные образцы йогурта не соответствуют основным показателям безопасности согласно требованиям ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия» [43], ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» и ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [117, 118].

ГЛАВА 4 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходя из проанализированной отечественной и зарубежной литературы, а также собственных результатов исследований, приведенных в разделах экспериментальной части данной диссертационной работы, оптимизирована методика одновременного определения трех антибиотиков группы амфениколы методом ВЭЖХ-МС/МС и проведена ее валидация. На основании проведенных исследований обоснована целесообразность проведенной оптимизации.

4.1 Оптимизация метода определения антибиотиков группы амфениколов методом ВЭЖХ-МС/МС

Для оптимизации метода одновременного определения остаточных количеств трех антибиотиков группы амфениколов (хлорамфеникола, флорфеникола и флорфеникол амина) в качестве основы выбрана метод в соответствии с ГОСТ 54904-2012, т. е. метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [49].

Подготовка хромато-масс-спектрометра к работе и создание метода осуществлялись на жидкостном хроматографе Shimadzu Corporation с хромато-масс-спектрометрическим детектором в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора с использованием программного обеспечения LabSolutions LCMS Release 5.86. SP1. Хроматографическое разделение антибиотиков группы амфениколов проводили в условиях, представленные в таблице 4.1.1, в режиме градиентного элюирования.

Для идентификации исследуемой группы антибиотиков подбирали параметры масс-спектрометрического детектирования.

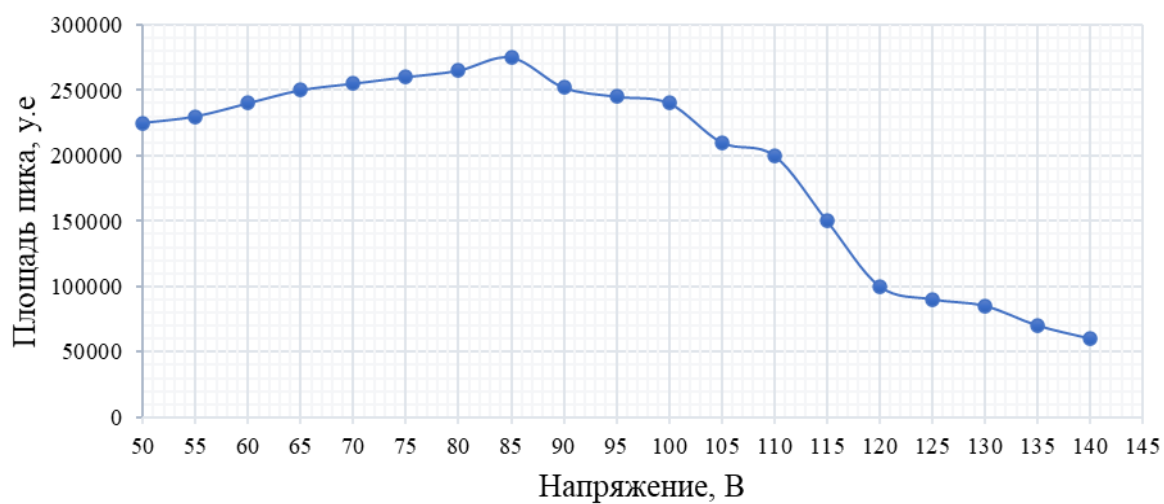
Таблица 4.1.1 – Параметры масс-спектрометрического детектирования

| Параметр | Значение |
|--|----------|
| Скорость потока подвижной фазы, мл/мин | 0,3±0,01 |
| Температура колонки, °С; | 40±0,01 |
| Объем инъекции, мкл | 20±0,01 |
| Поток газа распылителя, л/мин | 3±0,01 |
| DL температура, °С; | 250±0,01 |
| Температура теплового блока, °С; | 400±0,10 |
| Поток газа осушителя, л/мин | 15±0,01 |
| Температура окружающего воздуха, °С; | 20±0,10 |
| Атмосферное давление, кПа | 90±0,16 |
| Напряжение в электросети, В | 220±1,00 |
| Частота тока в электросети, Гц | 50±1,00 |
| Относительная влажность воздуха, % | 55±5,00 |

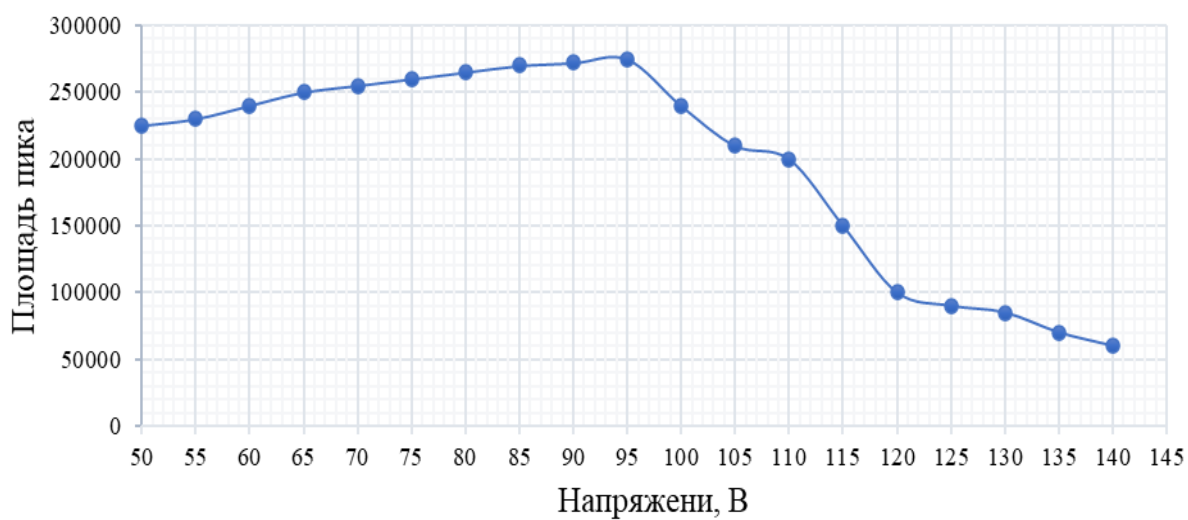
Попадая в детектор масс-спектрометра, молекула вещества ионизировалась за счет создаваемого напряжения на фрагментаторе, образуя ион-предшественник. Полученный ион распадался на более мелкие – дочерние ионы. Детектирование вещества осуществляли по иону-предшественнику и образовавшимся дочерним ионам.

С целью определения иона-предшественника для каждого из исследуемых соединений подбирали оптимальные значения напряжения на фрагментаторе. Для это в детектор вводили растворы исследуемых амфениколов с концентрациями 1,0 мкг/см³ и исследовали их полные масс-спектры. Ион-предшественник выбирали из наиболее интенсивных сигналов. Ионизацию амфениколов осуществляли методом электро-спрея (ESI) с регистрацией отрицательных ионов.

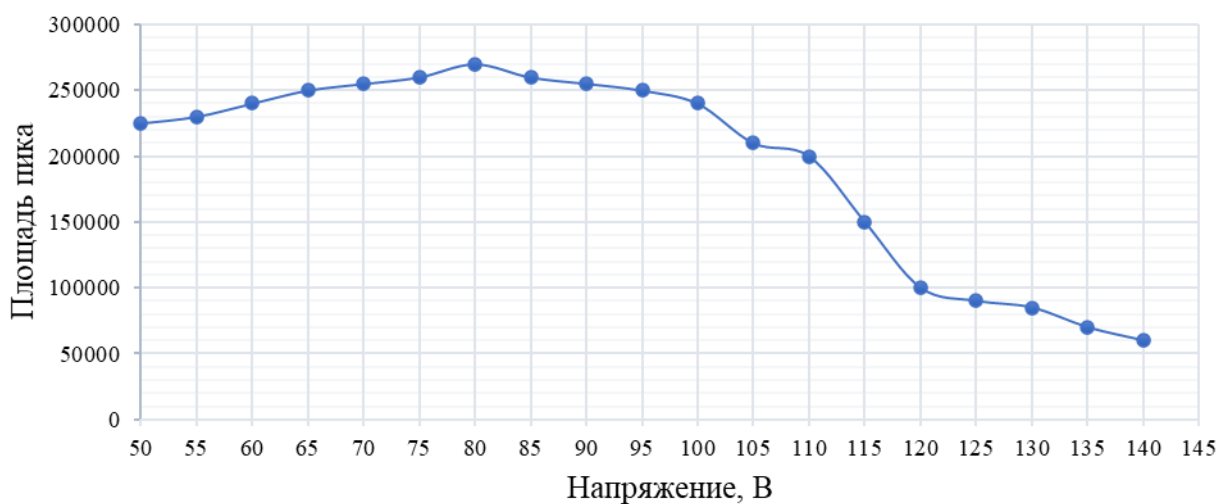
На рисунке 4.1.1 представлена зависимость интенсивности отклика от напряжения на фрагментаторе.



а)



б)



в)

Рисунок 4.1.1 – Влияние напряжения на фрагментаторе на интенсивность отклика амфениколов: а) хлорамфеникол; б) флорфеникол; в) флорфеникол амин

Данные рисунка 4.1.1 свидетельствуют о том, что наиболее интенсивный отклик от полученных ионов-предшественников достигается при следующих значениях напряжения на фрагментаторе: для хлорамфеникола при 85,0 В, для флорфеникола при 95 В, для флорфеникол амина при 80,0 В.

В ходе проведения исследования были получены масс-спектры (рисунок 4.1.2–4.1.4) амфениколов при оптимальном и наивысшем напряжении на фрагментаторе.

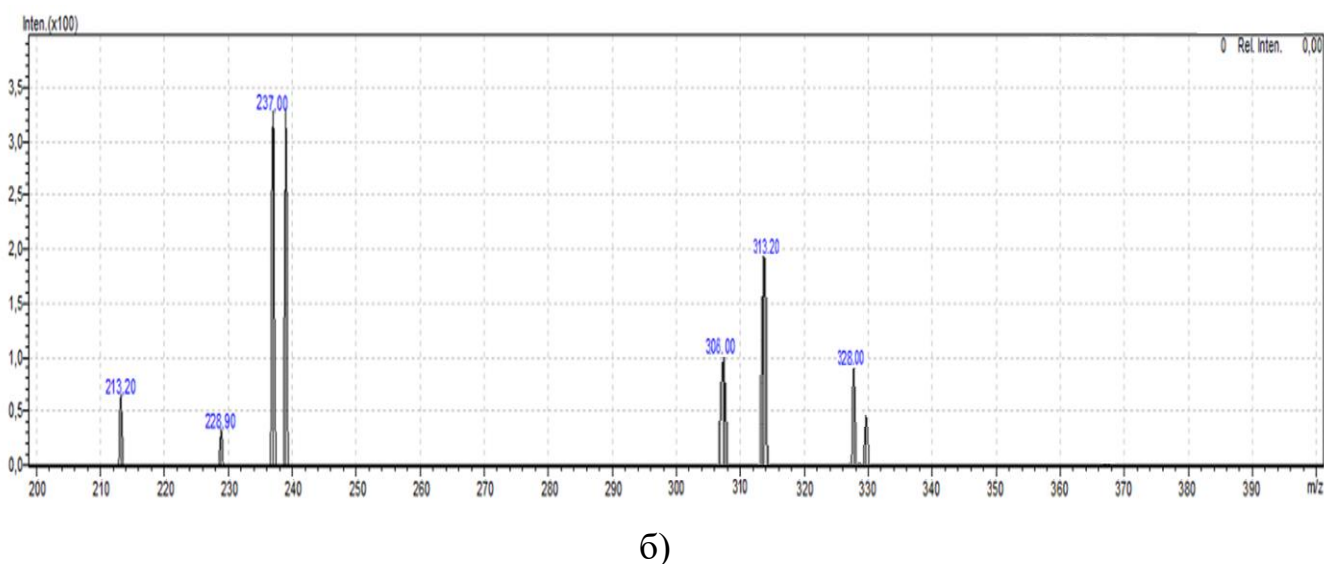
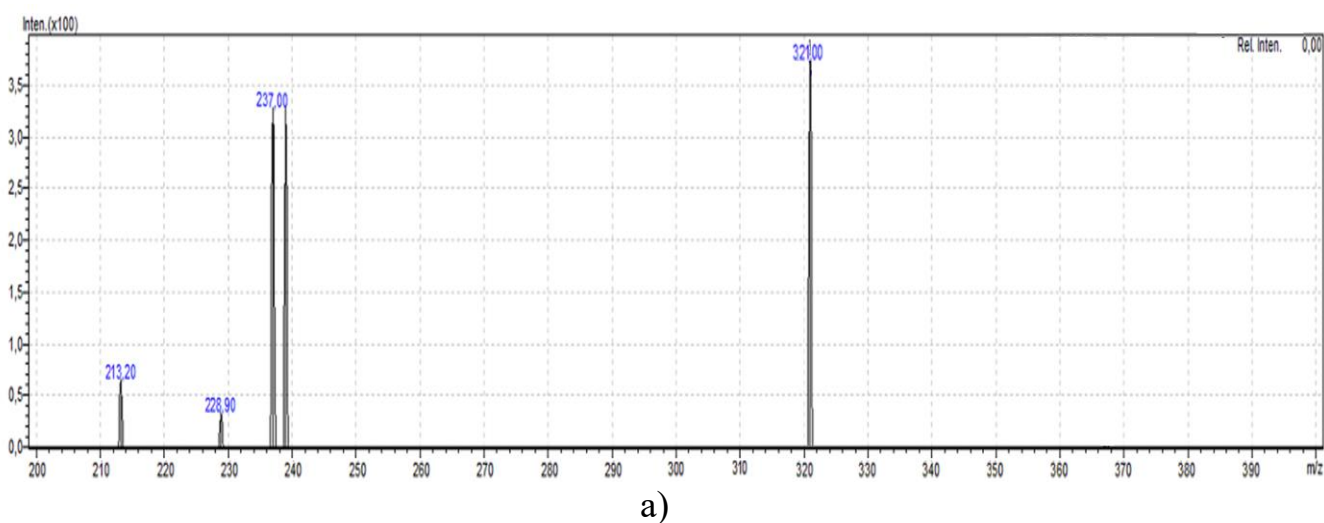
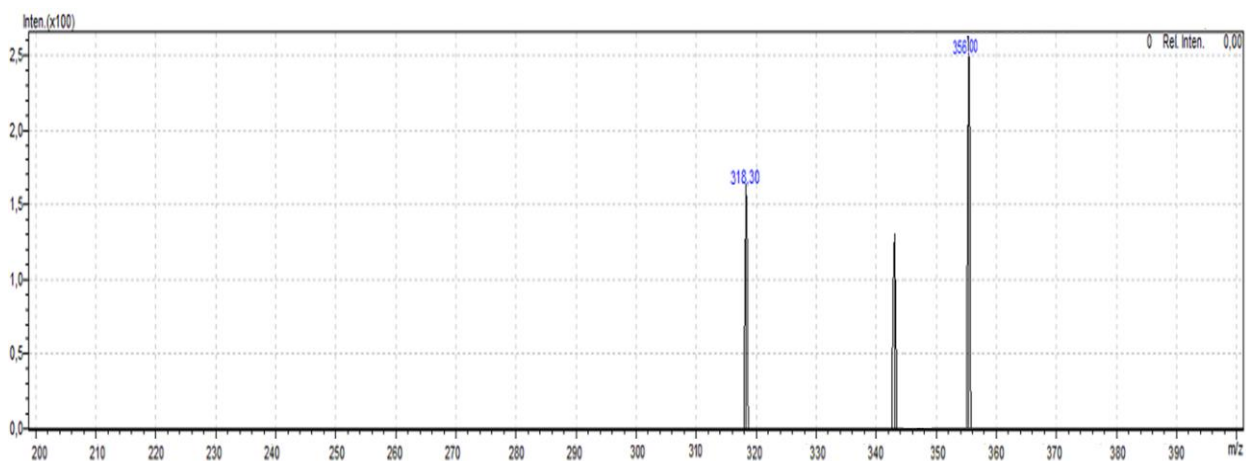
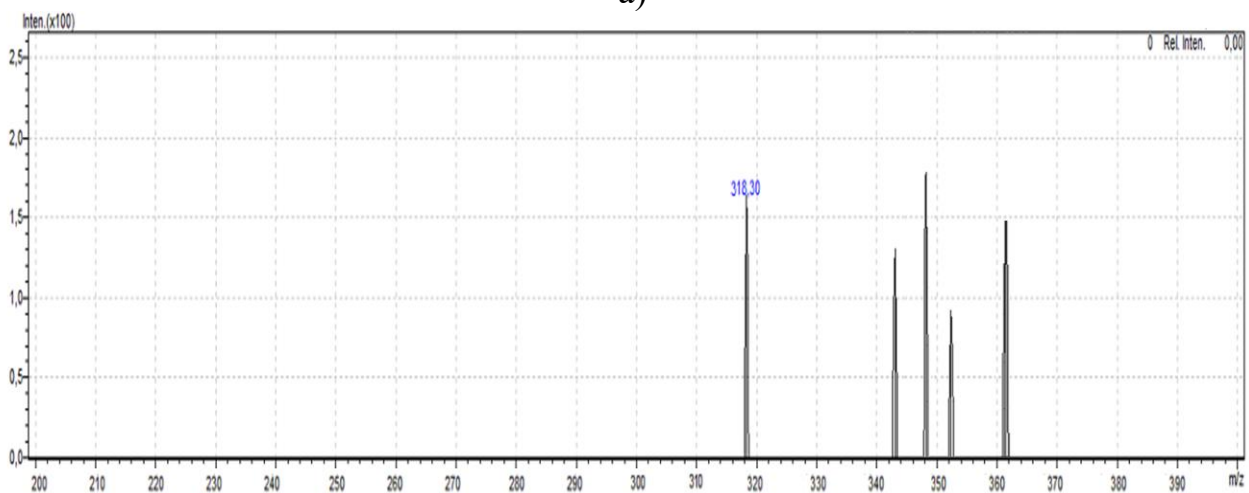


Рисунок 4.1.2 – Масс-спектры хлорамфеникола при напряжении на фрагментаторе: а) 85,0 В; б) 135,0 В

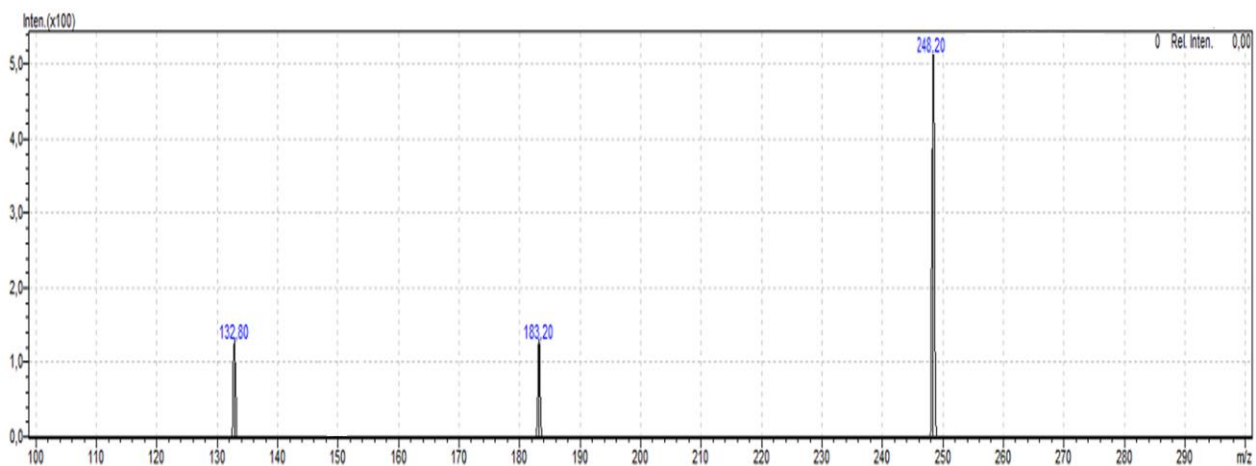


а)

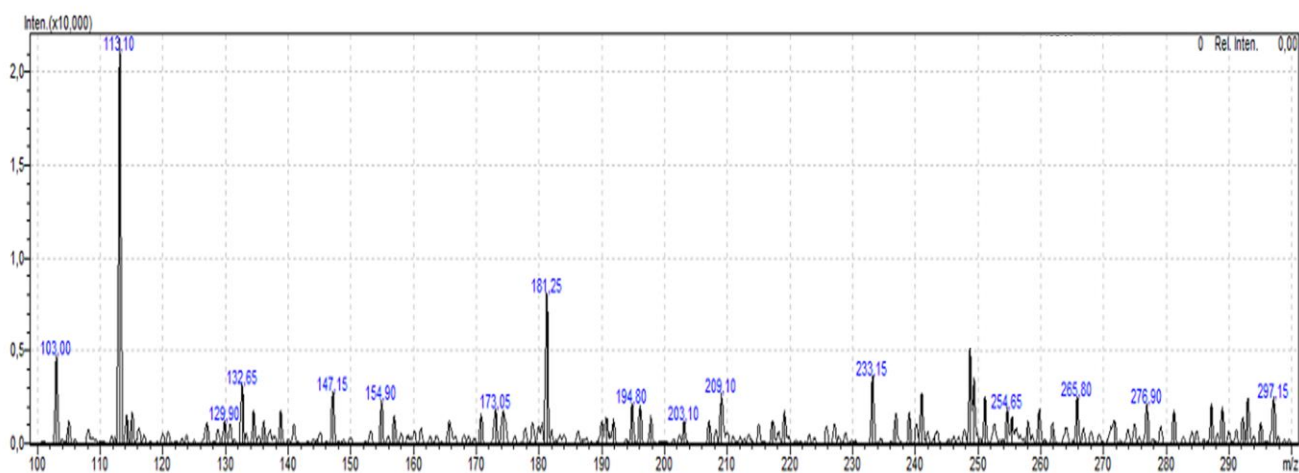


б)

Рисунок 4.1.3 – Масс-спектры флорфеникола при напряжении на фрагменторе: а) 90,0 В; б) 140,0 В



а)



б)

Рисунок 4.1.4 – Масс-спектры флорфеникол амина при напряжении на фрагментаторе: а) 90,0 В; б) 140,0 В

Полученные в результате проводимых исследований данные свидетельствуют о том, что подобранные напряжения на фрагментаторе являются оптимальными для эффективного переноса исходных ионов анализируемых веществ. Ионы-предшественники хлорамфеникола (m/z 321,0), флорфеникола (m/z 356,0) и флорфеникол амина (m/z 248,0) являются преобладающими ионами с выраженной интенсивностью отклика. Увеличение напряжения на фрагментаторе до значений свыше 135,0–140,0 В привело к образованию множества более мелких ионов и невозможности регистрации их на детекторе.

От значений энергий соударений зависят фрагментации ионов-предшественников. Поэтому было рассмотрено влияние энергии соударения на образовавшиеся дочерние ионы.

Для иона-предшественника хлорамфеникола с m/z 321,0 были определены три наиболее интенсивных дочерних иона – m/z 152,0, 257,0, 121,0, а также исследовано влияние энергии соударения на интенсивность отклика. Полученная зависимость влияния энергии соударения на интенсивность отклика представлена на рисунке 4.1.5.

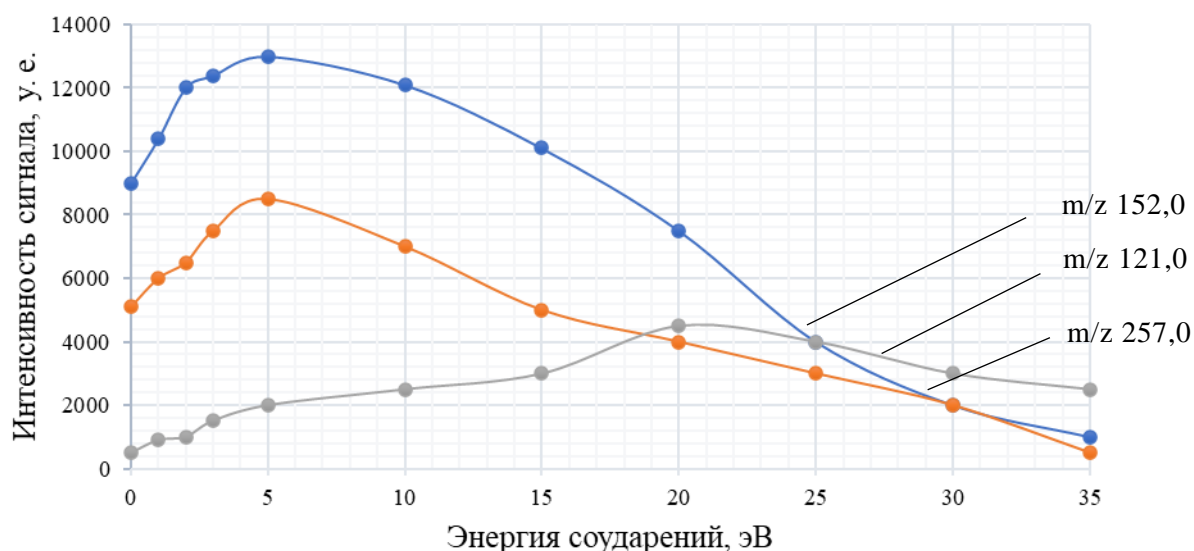


Рисунок 4.1.5 – Влияние значения энергии соударений на интенсивность отклика дочерних ионов хлорамфеникола

Из зависимостей, представленных на рисунке 4.1.5, видно, что наиболее интенсивный отклик для дочернего иона с m/z 152,0 был получен при энергии соударения 5 эВ. Менее интенсивный сигнал получился у дочернего иона с m/z 257,0 при схожем значении энергии (5,0 эВ). Дочерний ион с m/z 121,0 достигает максимального отклика при энергии соударения 20,0 эВ, но интенсивность отклика гораздо ниже в сравнении с двумя другими. Анализ данных рисунка 4.1.5 позволил сделать вывод, что для идентификации иона хлорамфеникола необходимо использовать дочерний ион с m/z 152,0, а дочерние ионы с m/z 257,0 и 121,0 необходимы в качестве подтверждения полученных данных.

Для ионов-предшественников флорфеникола с m/z 356,0 и флорфеникол амина с m/z 248,2 были проведены аналогичные исследований. Были определены наиболее интенсивные дочерние ионы: для флорфеникола m/z 185,10 и 119,1, для флорфеникол амина m/z 230,1 и 130,1. Полученные зависимости представлены на рисунках 4.1.6 и 4.1.7.

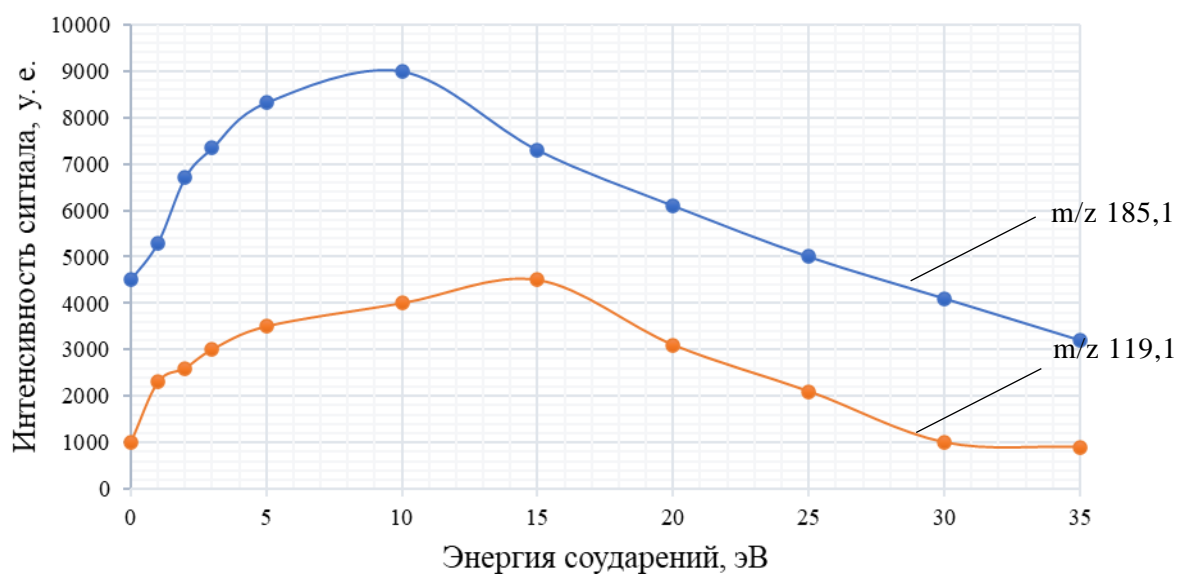


Рисунок 4.1.6 – Влияние значения энергии соударений на интенсивность отклика дочерних ионов флорфеникола

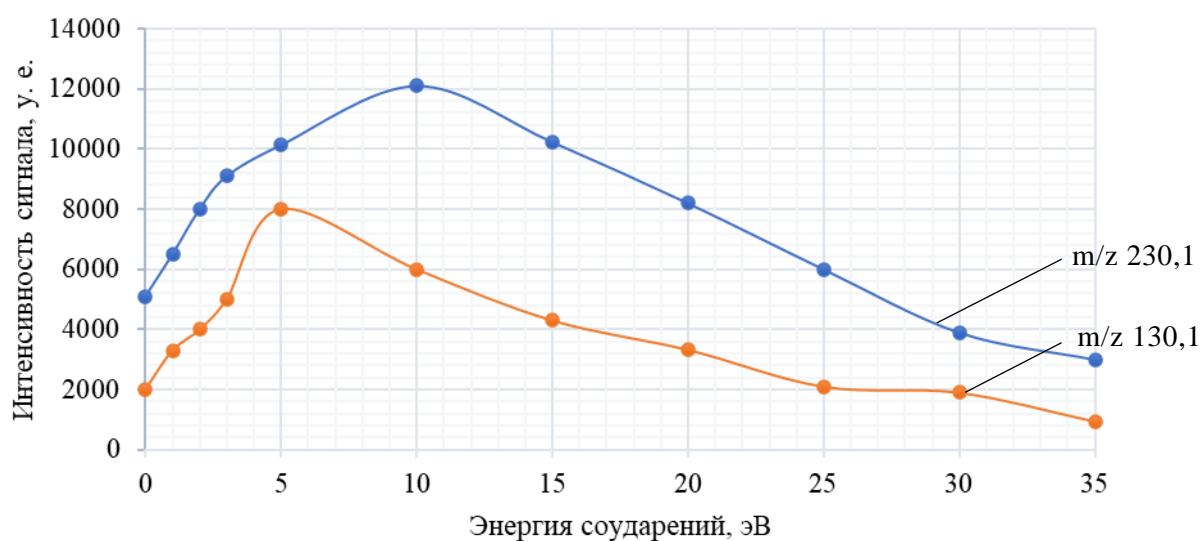


Рисунок 4.1.7 – Влияние значения энергии соударений на интенсивность отклика дочерних ионов флорфеникол амина

Анализ рисунков 4.1.6 и 4.1.7 показал, что для идентификации иона флорфеникола необходимо использовать дочерний ион с m/z 185,1, а дочерний ион с m/z 119,1 для подтверждения достоверности. Наиболее интенсивные отклики для дочерних ионов были достигнуты при значениях энергии соударения 10,0 и 15,0 эВ.

Для определения иона флорфеникол амина необходимо использовать дочерний ион с m/z 230,1, а дочерний ион с m/z 130,1 – как подтверждение достоверности полученных данных. Наиболее интенсивные отклики для дочерних ионов были достигнуты при значениях энергии соударения 10,0 и 5,0 эВ.

В результате проведенных исследований были подобраны оптимальные параметры масс-спектрометрического детектирования, значения которых представлены в таблице 4.1.2.

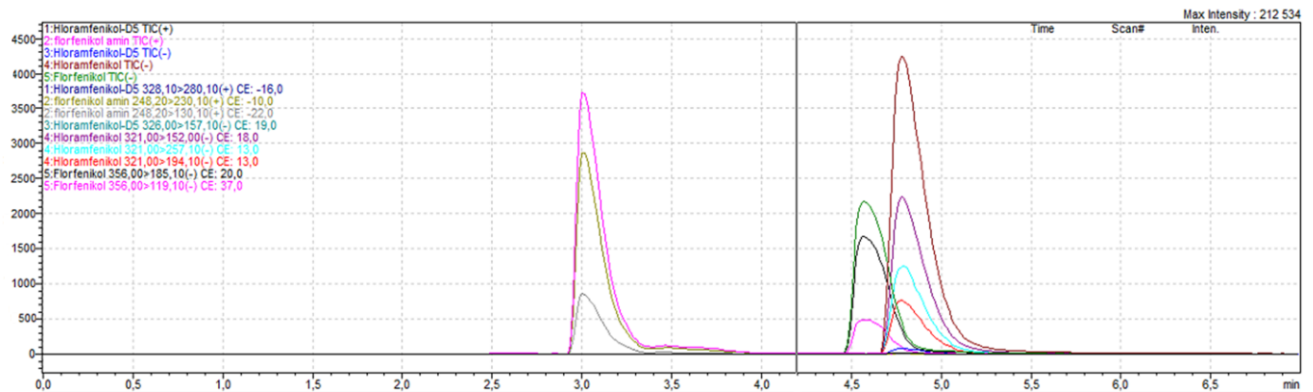
Таблица 4.1.2 – Подобранные параметры воздействия на ионы амфениколов в режиме MRM и условиях электроспрея с регистрацией ионов

| Наименование амфеникола | Ион-предшественник, m/z | Дочерние ионы, m/z | Напряжение на фрагментаторе, В | Энергия соударения, эВ |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------|
| Хлорамфеникол (-) | 321,0 | 152,0/257,1/ 194,1 | 85,0 | 5,0/5,0/20,0 |
| Флорфеникол (-) | 356,0 | 185,1/119,1 | 90,0 | 10,0/15,0 |
| Флорфеникол амин (+) | 248,2 | 230,1/130,1 | 80,0 | 10,0/5,0 |
| Хлорамфеникол-Д5(-) | 326,0 | 157,1 | 85,0 | 5,0 |

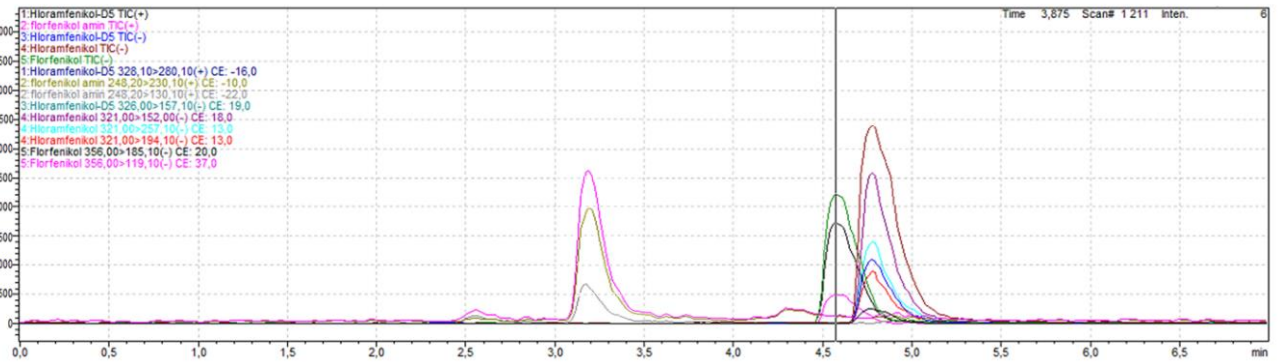
Принимая во внимание тот факт, что определение оптимальных масс-спектрометрических параметров детектирования проводилось на конкретном оборудовании, дальнейшие исследования будут направлены на унификацию подобранных параметров.

Проведенный анализ литературы позволил выделить несколько модифицированных методов определения амфениколов с использованием водной фазы, в состав которой входят различные модификаторы. С целью оптимизации было изучено влияние состава элюента А на интенсивность отклика исследуемых антибиотиков. Для проведения исследования рассматривали подвижную фазу, состоящую из: а) 0,1 % раствора муравьиной кислоты; б) деионизированной воды; в) 0,1 % водного раствора фосфорной кислоты. Состав подвижной фазы Б

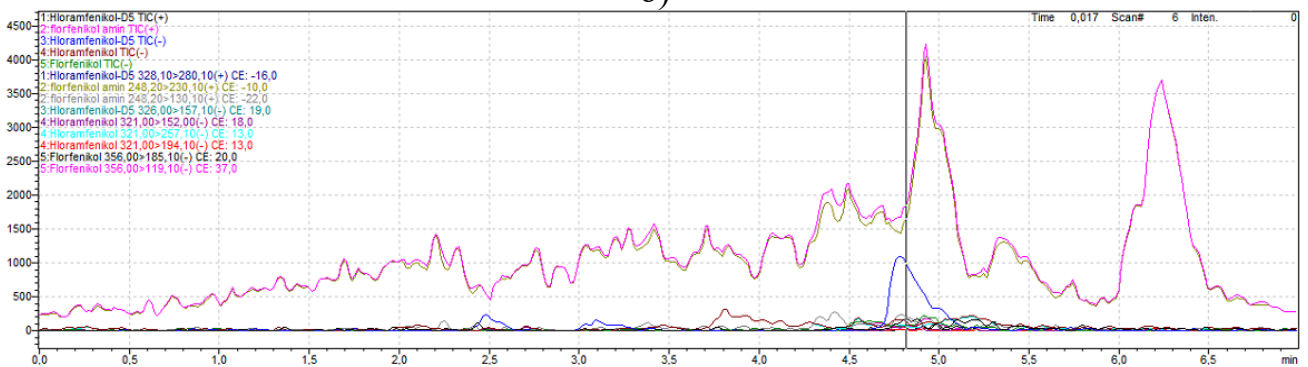
оставался без изменений (метанол). Результаты проведенных исследования представлены на рисунке 4.1.8.



а)



б)



в)

Рисунок 4.1.8 – Влияние состава подвижной фазы А:

а) 0,1 % раствор муравьиной кислоты; б) деионизированная вода;

в) 0,1 % водный раствор фосфорной кислоты

Установлено, что использование 0,1 % раствора муравьиной кислоты приводит к увеличению интенсивности откликов амфениколов по сравнению с деионизированной водой. Применение в качестве подвижной фазы А 0,1 % водного

раствора фосфорной кислоты привело к появлению шумов и смещению времен удерживания, а также к плохому выходу исследуемых антибиотиков. Природа катионов и анионов, присутствующих в подвижной фазе А, влияет на ионизацию аналитов и приводит к образованию аддуктов с соотношением массы к заряду, отличным от регистрируемых масс-спектрометром. Поэтому в качестве элюента А использовали 0,1 % раствор муравьиной кислоты.

Основное воздействие на качественное разделение антибиотиков оказывает неподвижная фаза. Ее состав зависит от особенностей физико-химических свойств исследуемых компонентов. Исходя из изучения химического строения амфениколов, можно заметить, что они содержат ионизируемые группы, характеризующиеся константой кислотности. Антибиотики имеют константу кислотности около 7,50. Это означает, что в водном растворе они не ионизированы. Кроме того, все эти исследуемые соединения имеют структуру, содержащую одну или несколько групп –ОН, а также группу –NH. Проанализировав особенности строения антибиотиков группы амфениколы, можно полагать, что наиболее оптимальным составом неподвижной фазы является поверхность диоксида кремния, который обладает пониженным количеством активных силанолов. Эти характеристики неподвижной фазы могут влиять на удерживание и разделение соединений.

В качестве неподвижной фазы использовали обращенно-фазовые хроматографические колонки Pursuit XR_s C18 (Agilent), Luna C18 (Phenomenex) и PerfectSil 100 ODS-3 (MZ-Analysentechnik GmbH). Основные характеристики выбранных для исследования хроматографических колонок представлены в таблице 4.1.3.

Таблица 4.1.3 – Характеристики хроматографических колонок

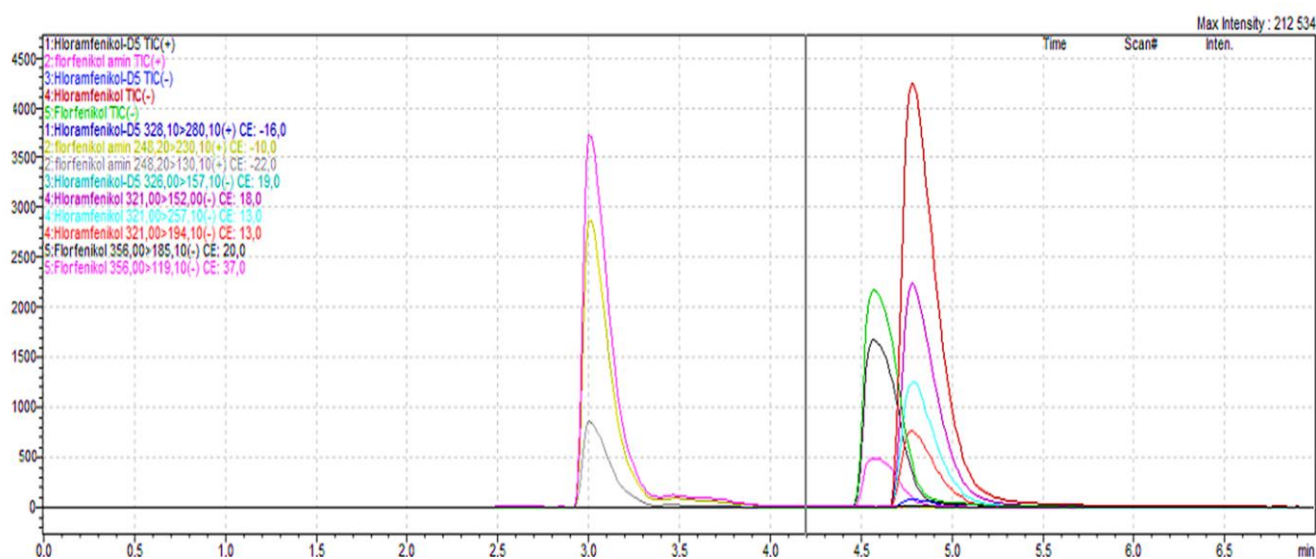
| Характеристика | Pursuit XR _s C18 | Luna C18 | PerfectSil 100 ODS-3 |
|--|-----------------------------|----------|----------------------|
| Зернение, мкм | 5,0 | 5,0 | 3,5 |
| Эффективная поверхность, м ² /г | 440,0 | 440,0 | 450,0 |
| Рабочий диапазон, pH | 1,5–10,0 | 1,5–10,0 | 2,0–11,0 |

Продолжение таблицы 4.1.3

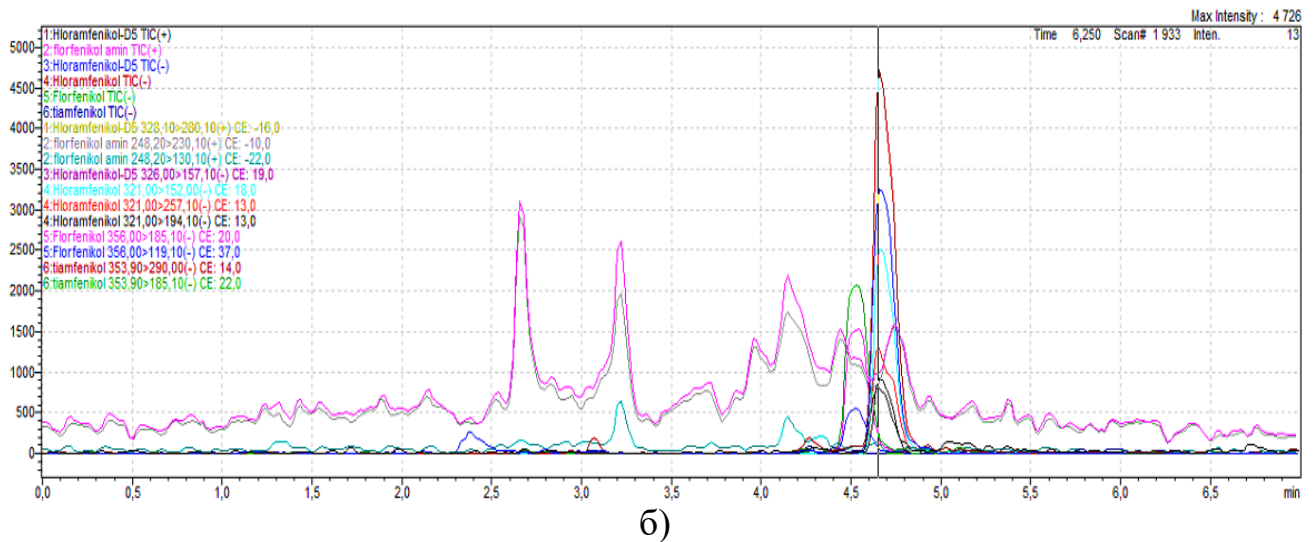
| Характеристика | Pursuit XRs C18 | Luna C18 | PerfectSil 100 ODS-3 |
|------------------------|-----------------|----------|----------------------|
| Рабочий диапазон, рН | 1,5–10,0 | 1,5–10,0 | 2,0–11,0 |
| Чистота силикагеля, % | 99,8 | 99,9 | 99,9 |
| Содержание углерода, % | 22,0 | 19,0 | 15,0 |
| Классификация по USP | L1 | L1 | L1 |
| Длина, мм | 150,0 | 150,0 | 150,0 |

*L1 – Пористые силикагельные или керамические частицы диаметром от 3 до 10 мкм, химически модифицированные октадецильными группами

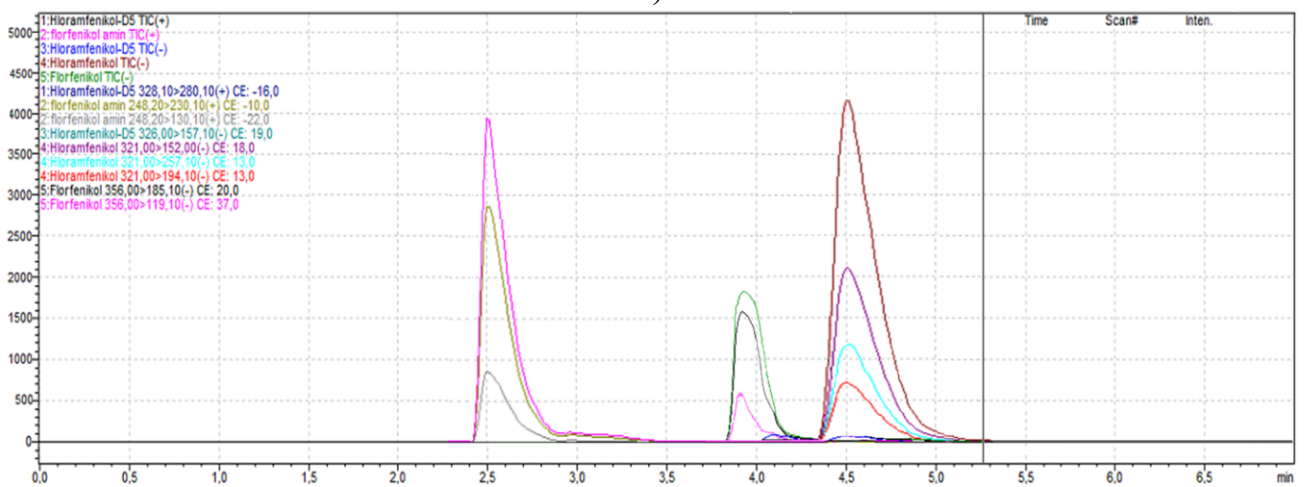
Изучение влияния состава неподвижной фазы проводили с использованием установленного режима градиентного элюирования. Модельную смесь амфениколов, в состав которой входили хлорамфеникол, флорфеникол и флорфеникол амин, готовили из исходных растворов антибиотиков ($C = 200 \text{ мкг/см}^3$ в метаноле). Полученную смесь растворяли в деионизированной воде и вводили в хроматограф. Хроматограммы разделения смеси амфениколов представлены на рисунке 4.1.9.



а)



б)



в)

Рисунок 4.1.9 – Удерживание амфениколов на различных хроматографических колонках: а) Pursuit XRs C18; б) Luna C18; в) PerfectSil 100 ODS-3

На основании данных, представленных на рисунке 4.1.9, сформулировали вывод о том, что разделение компонентов на указанных колонках осуществляется за счет взаимодействия неполярной алкильной группы неподвижной фазы с гидрофобной частью исследуемых антибиотиков. Установлено, что при заданных условиях градиентного разделения только колонки Pursuit XRs C18 (а) и PerfectSil 100 ODS-3 (в) обеспечивают разделение и удерживание амфениколов.

Было установлено, что разделение и удерживание смеси амфениколов на неподвижной фазе колонки PerfectSil 100 ODS-3 (в) достигнуто в наибольшей степени относительно фазы колонки Pursuit XRs C18 (а). Полученные результаты связаны с размером частиц сорбента, заполняющего колонку. Меньшей размер частиц

обеспечивает большую площадь поверхности сорбента и тем самым способствует лучшему разделению исследуемых компонентов. Из результатов, представленных на рисунке 4.1.8, видно, что подобранная колонка для хроматографического разделения увеличивает интенсивность пика и сокращает длительность анализа.

4.2 Сравнительный анализ методов определения антибиотиков группы амфениколов методом ВЭЖХ-МС/МС

В результате проведенных исследований был оптимизирован метод одновременного определения остаточных количеств трех антибиотиков группы амфениколов. Для подтверждения эффективности метода, проводили сравнительный анализ разработанного (метод А) и существующего (метод Б, согласно ГОСТ 54904-2012) методов определения антибиотиков [49].

Основными критериями при выборе условий анализа служили его продолжительность, времена удерживания определяемых веществ, интенсивность отклика исследуемых антибиотиков и степень их извлечения из пищевых матриц.

В таблицах 4.2.1–4.2.3 представлены основные различия хроматографических параметров рассматриваемых методов.

Высокая эффективность экстракции амфениколов в эвтектический растворитель на основе муравьиной кислоты позволила добиться повышения чувствительности метода для их определения в молоке и молочных продуктах ниже уровня ПДК согласно ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [118]. Оптимизация метода определения амфениколов позволила также добиться снижения предела определения до 0,15 мкг/кг для хлорамфеникола и сокращения времени проведения анализа до 7,0 минут, что на 6,0 минут меньше гостированного метода.

Таблица 4.2.1 – Условия разделения амфениколов в режиме градиентного элюирования для метода А и Б (скорость потока 0,3 мл/мин)

| Метод А | | |
|------------|---|---------------------------------|
| Время, мин | Подвижная фаза: А: 0,1 % раствор муравьиной кислоты, % | Подвижная фаза Б: метанол, % |
| 0–0,5 | 90 | 10 |
| 0,5–3,5 | 20 | 80 |
| 3,5–5,5 | 10 | 90 |
| 5,5–7,0 | 90 | 10 |
| Метод Б | | |
| Время, мин | Вода, % | Метанол, % |
| 0–0,5 | 75 | 25 |
| 0,5–4,0 | 0 | 100 |
| 4,0–6,5 | 0 | 100 |
| 6,5–13,0 | 75 | 25 |

Таблица 4.2.2 – Подобранные параметры воздействия на ионы амфениколов в режиме MRM и условиях электроспрея с регистрацией ионов

| Наименование амфеникола | Ион предше- ственник- ник, m/z | Дочерние ионы, m/z | Время удержи- вания, мин |
|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Метод А | | | |
| Хлорамфеникол (-) | 321,0 | 152,0 257,1 194,1 | 2,40±0,1 |
| Флорфеникол (-) | 356,0 | 185,1 119,1 | 3,83±0,1 |
| Флорфеникол амин (-) | 248,2 | 230,1 130,1 | 4,43±0,1 |
| Метод Б | | | |
| Хлорамфеникол (-) | 321,0 | 152,0 257,1 194,1 | 6,70±0,1 |

Продолжение таблицы 4.2.2

| Наименование амфеникола | Ион предшественник, m/z | Дочерние ионы, m/z | Время удерживания, мин |
|-------------------------|-------------------------|--------------------|------------------------|
| Флорфеникол (-) | 356,0 | 185,1 119,1 | 8,70±0,1 |
| Флорфеникол амин (-) | 356,0 | 185,1 119,1 | 9,34±0,1 |

Основные аналитические характеристики оптимизированного метода представлены в таблице 4.2.3

Таблица 4.2.3 – Аналитические характеристики способа определения амфениколов в молоке и молочной продукции

| Параметр | Название антибиотика | | |
|--|----------------------|-------------|------------------|
| | Хлорамфеникол | Флорфеникол | Флорфеникол амин |
| Метод А | | | |
| Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг | 0,15–1000,0 | 1,0–1000,0 | 1,0–1000,0 |
| Коэффициент корреляции (R^2) | 0,999 | 0,998 | 0,999 |
| Предел обнаружения, мкг/кг | 0,15±0,01 | 1,0±0,01 | 1,0±0,01 |
| Коэффициент концентрирования | 20 | 48 | 47 |
| Время пробоподготовки, мин | 60±0,1 | | |
| Время анализа, мин | 7,0 | | |
| Метод Б | | | |
| Диапазон определяемых концентраций, мкг/кг | 0,2–1000,0 | 1,0–1000,0 | 1,0–1000,0 |
| Коэффициент корреляции (R^2) | 0,975 | 0,995 | 0,997 |
| Предел обнаружения, мкг/кг | 0,2±0,01 | 1,0±0,01 | 1,0±0,01 |
| Коэффициент концентрирования | 35 | 50 | 49 |
| Время пробоподготовки, мин | 60±0,1 | | |
| Время анализа, мин | 13,0 | | |

Поскольку основная задача, поставленная в рамках диссертационной работы, заключается в оптимизации метода для определения антибиотиков в реальных пищевых продуктах, то на следующем этапе исследований оценивали эффективность оптимизированного метода на таких пищевых матрицах, как молоко 3,5 % жирности и йогурт 5,8 % жирности (молочная продукция), и проводили сравнение с гос-тированным методом (метод Б). В таблицах 4.2.4 и 4.2.5 представлены степени извлечения амфениколов из молока (3,5 % жирности) и йогурта (5,8 % жирности) на трех уровнях добавок 1,0, 10,0, 20,0 и 0,15 мкг/кг для хлорамфеникола.

Таблица 4.2.4 – Степень извлечения амфениколов из молока

| Антибиотик | Средний коэффициент извлечения, % | | | |
|------------------|-----------------------------------|------------|-------------|-------------|
| | 0,15 мкг/кг | 1,0 мкг/кг | 10,0 мкг/кг | 20,0 мкг/кг |
| Метод А | | | | |
| Хлорамфеникол | 91,31±0,01 | 98,80±0,02 | 99,71±0,02 | 101,31±0,01 |
| Флорфеникол | – | 98,12±0,01 | 99,11±0,02 | 100,11±0,03 |
| Флорфеникол амин | – | 98,10±0,03 | 99,20±0,01 | 101,11±0,01 |
| Метод Б | | | | |
| Хлорамфеникол | – | 98,10±0,01 | 90,11±0,01 | 88,61±0,01 |
| Флорфеникол | – | 90,41±0,02 | 88,72±0,01 | 88,72±0,02 |
| Флорфеникол амин | – | 89,11±0,02 | 88,70±0,03 | 88,71±0,01 |

Таблица 4.2.5 – Степень извлечения амфениколов из молочной продукции (йогурта)

| Антибиотик | Средний коэффициент извлечения, % | | | |
|------------------|-----------------------------------|-------------|------------|-------------|
| | 0,15 мкг/кг | 0,5 мкг/кг | 1,0 мкг/кг | 10,0 мкг/кг |
| Метод А | | | | |
| Хлорамфеникол | 89,11±0,01 | 100,21±0,01 | 99,40±0,02 | 100,31±0,02 |
| Флорфеникол | – | 99,81±0,03 | 99,81±0,01 | 99,71±0,02 |
| Флорфеникол амин | – | 99,42±0,01 | 99,91±0,03 | 99,90±0,01 |
| Метод Б | | | | |
| Хлорамфеникол | – | 88,61±0,02 | 89,11±0,01 | 91,41±0,03 |

Продолжение таблицы 4.2.5

| Антибиотик | Средний коэффициент извлечения, % | | | |
|------------------|-----------------------------------|------------|------------|-------------|
| | 0,15 мкг/кг | 0,5 мкг/кг | 1,0 мкг/кг | 10,0 мкг/кг |
| Флорфеникол | – | 90,11±0,02 | 92,02±0,02 | 91,31±0,01 |
| Флорфеникол амин | – | 90,70±0,02 | 90,21±0,01 | 91,92±0,02 |

Установлено, что степень извлечения амфениколов из молока и йогурта, в зависимости от уровня добавки, варьирует свои значения от 98,10±0,03 до 101,31±0,01 % и от 99,40±0,01 до 100,21±0,01 % соответственно, что в среднем на 10 % превышает коэффициент извлечения антибиотиков из матриц при использовании гостированного метода. Пробы обогащённые на уровне добавки антибиотика 0,15 мкг/кг для хлорамфеникола гостированным методом не были определены.

Полученные результаты проведенного сравнительного анализа подтверждают эффективность оптимизированного метода. Следовательно, данный аналитический метод предпочтителен и рекомендуется для определения остаточного количества антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочной продукции.

4.3 Валидация метода определения антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции

Валидация является обязательным процессом при разработке аналитического метода исследования веществ. Это процедура выполнения многочисленных оценок, предназначенных для проверки того, что аналитическая тестовая система подходит для ее предполагаемой цели и способна предоставлять полезные и достоверные аналитические данные. Основная цель валидации – продемонстрировать, что аналитический метод подходит для предполагаемой цели, является точным, специфичным и прецизионным в указанном диапазоне, в котором будет анализироваться аналит. Валидация аналитического метода должна

проводиться для новых методов анализа или для существующих методов, когда вносятся какие-либо изменения в процедуру, состав лекарственного препарата и синтез лекарственных субстанций.

Валидацию методики осуществляли согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 и Решению Комиссии 2002/657/ЕС по следующим параметрам [86, 99]:

1. Селективность/специфичность (влияние матрицы);
2. Линейность;
3. Правильность;
4. Повторяемость/сходимость;
5. Внутрिलाбораторная прецизионность.

Специфичность. В условиях валидируемой методики необходимо точно провести исследование анализируемого компонента и отличить его от веществ, схожих по своему строению и присутствующих в исследуемой матрице.

Специфичность определяли путем исследования не менее 20 чистых проб и 20 обогащенных на уровне предела количественного определения образцов (0,2 мкг/кг для хлорамфеникола, 1,0 мкг/кг для флорфеникола и флорфеникол амина). Критерием специфичности являлся результат измерения «обнаружено» в соответствии с 2002/657/ЕС [99]. Полученные результаты определения специфичности методики представлены в таблице 4.3.1

Таблица 4.3.1 – Специфичность валидируемой методики

| Матрица | № п/п | Хлорамфеникол | | Флорфеникол | | Флорфеникол амин | |
|---------|-------|---------------|-------------------|-------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | Бланк | Обогащенные пробы | Бланк | Обогащенные пробы | Бланк | Обогащенные пробы |
| Молоко | 2 | - | + | - | + | - | + |
| | 3 | - | + | - | + | - | + |
| | 4 | - | + | - | + | - | + |
| | 5 | - | + | - | + | - | + |
| | 6 | - | + | - | + | - | + |

Продолжение таблицы 4.3.1

| Матрица | № п/п | Хлорамфеникол | | Флорфеникол | | Флорфеникол амин | |
|----------------------------|----------|---------------|----------------------|-------------|----------------------|------------------|----------------------|
| | | Бланк | Обогащенные пробы | Бланк | Обогащенные пробы | Бланк | Обогащенные пробы |
| | 7 | - | + | - | + | - | + |
| | 8 | - | + | - | + | - | + |
| | 9 | - | + | - | + | - | + |
| | 10 | - | + | - | + | - | + |
| | 11 | - | + | - | + | - | + |
| | 12 | - | + | - | + | - | + |
| | 13 | - | + | - | + | - | + |
| | 14 | - | + | - | + | - | + |
| | 15 | - | + | - | + | - | + |
| | 16 | - | + | - | + | - | + |
| | 17 | - | + | - | + | - | + |
| | 18 | - | + | - | + | - | + |
| | 19 | - | + | - | + | - | + |
| 20 | - | + | - | + | - | + | |
| Выявлено несоответствий | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Молочная продукция | 1 | - | + | - | + | - | + |
| | 2 | - | + | - | + | - | + |
| | 3 | - | + | - | + | - | + |
| | 4 | - | + | - | + | - | + |
| | 5 | - | + | - | + | - | + |
| | 6 | - | + | - | + | - | + |
| | 7 | - | + | - | + | - | + |
| | 8 | - | + | - | + | - | + |
| | 9 | - | + | - | + | - | + |
| | 10 | - | + | - | + | - | + |
| | 11 | - | + | - | + | - | + |

Продолжение таблицы 4.3.1

| Матрица | № п/п | Хлорамфеникол | | Флорфеникол | | Флорфеникол амин | |
|-------------------------|-------|---------------|-------------------|-------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | Бланк | Обогащенные пробы | Бланк | Обогащенные пробы | Бланк | Обогащенные пробы |
| | 12 | - | + | - | + | - | + |
| | 13 | - | + | - | + | - | + |
| | 14 | - | + | - | + | - | + |
| | 15 | - | + | - | + | - | + |
| | 16 | - | + | - | + | - | + |
| | 17 | - | + | - | + | - | + |
| | 18 | - | + | - | + | - | + |
| | 19 | - | + | - | + | - | + |
| | 20 | - | + | - | + | - | + |
| Выявлено несоответствий | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Из данных таблицы 4.3.1 следует, что методика определения антибиотиков группы амфениколы является специфичной. На хроматограммах чистых проб отсутствуют пики с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания пиков амфениколов. Выявлено 0 несоответствий во всех исследуемых пробах, что удовлетворяет требованиям допустимой вероятности ошибки (β -ошибка ≤ 5 при $n \geq 20$).

Линейность. Линейность определяли путем построения градуировочной зависимости. Ее строили при помощи матричной градуировки. Для этого в анализируемую чистую пробу, согласно данным таблицы 4.3.2, добавляли растворы смесей амфениколов, раствор хлорамфеникола (для точки 0,2 нг/см³) и раствор внутреннего стандарта дейтерированного хлорамфеникола-Д5.

Пробоподготовку проводили согласно ГОСТ 54904-2012 [49]. В качестве чистых проб для получения матричных градуировочных растворов были использованы пробы матриц молока и молочной продукции (йогурт, творог, сметана, сыворотка).

В связи с тем, что между различными видами молочной продукции не наблюдалось выраженного «эффекта матрицы», набор статистических данных проходил с использованием одного вида молочной продукции (йогурт).

Таблица 4.3.2 – Приготовление матричных градуировочных растворов с массовыми концентрациями 0,2–1000,0 нг/см³ для хлорамфеникола, 1,0–1000,0 нг/см³ для остальных амфениколов и 40,0 нг/см³ внутреннего стандарта хлорамфеникола-Д5

| Концентрация амфениколов в градуировочном растворе, нг/см ³ | Концентрация вносимой смеси амфениколов, мкг/см ³ | Вносимый объем смеси амфениколов, см ³ | Объем внутреннего стандарта, см ³ |
|--|--|---|--|
| 0,2 (хлорамфеникол) | 0,1 (хлорамфеникол) | 0,002 (хлорамфеникол) | 0,040 |
| 1,0 | 1,0 | 0,001 | 0,040 |
| 10,0 | 1,0 | 0,010 | 0,040 |
| 100,0 | 10,0 | 0,010 | 0,040 |
| 1000,0 | 10,0 | 0,100 | 0,040 |

Для получения градуировочных данных использовали не менее четырех уровней массовых концентраций матричных градуировочных растворов. При построении градуировочной характеристики для количественного определения остаточного содержания амфениколов в инжектор хроматографа вводили не менее двух раз градуировочные растворы различных уровней массовых концентраций.

Градуировочную зависимость устанавливали в форме зависимости отношения массовой концентрации каждого амфеникола к массовой концентрации внутреннего стандарта ($C_{TC}/C_{вн.ст}$) от отношения площади хроматографического пика каждого амфеникола к площади пика внутреннего стандарта ($S_{TC}/S_{вн.ст}$) для более интенсивного фрагментного иона каждого амфеникола. Для построения градуировочных графиков использовали программу обработки данных

LaBSolutions Browser и методы для расчёта, созданные отдельно для каждой из матриц. В таблице 4.3.3 приведены полученные уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции R^2 для сырого молока и молочной продукции.

Таблица 4.3.3 – Диапазон линейности метода

| Матрица | Амфениколы | Уравнение линейности | Коэффициент корреляции | Наблюдаемый диапазон линейности, нг/см ³ |
|--------------------|------------------|-------------------------|------------------------|---|
| Молоко | Хлорамфеникол | $10,34301 \times x + 0$ | 0,99987 | (0,2–1000) |
| | Флорфеникол | $6,59222 \times x + 0$ | 0,99993 | (1–1000) |
| | Флорфеникол амин | $8,96611 \times x + 0$ | 0,99998 | (1–1000) |
| Молочная продукция | Хлорамфеникол | $10,60850 \times x + 0$ | 0,99995 | 0,2–1000 |
| | Флорфеникол | $6,48690 \times x + 0$ | 0,99998 | 1–1000 |
| | Флорфеникол амин | $13,82611 \times x + 0$ | 0,99995 | 1–1000 |

Согласно данным, представленным в таблице 4.3.3, все построенные калибровочные графики носили линейный характер. Градуировочная характеристика считалась приемлемой, т. к. рассчитанное значение квадрата коэффициента корреляции для градуировочной характеристики каждого фрагментного иона составила не менее 0,99.

Правильность, ходимость (повторяемость) и внутрилабораторная прецизионность. Правильность, сходимость и внутрилабораторную прецизионность валидируемой методики оценивали путем анализа обогащённых проб, содержащих 0,2, 0,3 и 0,45 мкг/кг для хлорамфеникола и 50,0, 100,0 и 150,0 мкг/кг для всех антибиотиков группы амфениколы.

Для оценки правильности использовали критерий истинности (%). Результаты оценки правильности представлены в таблице 4.3.4.

Согласно таблице 4.3.4, среднее значение истинности (восстановления) в диапазоне измерений 0,2–0,45 мкг/кг (для хлорамфеникола) составило 99,5 %, а в диапазоне измерений 50,0–150,0 мкг/кг – 99,8 %. Полученные значения в результате проводимых исследований полностью соответствуют критерию правильности методики.

Таблица 4.3.4 – Оценка правильности методики

| Уровень концентрации, мкг/кг | $X_{\text{ср.}}$, мкг/кг | Среднее значение восстановления, % | Допустимое значение, % | Матрица/амфеникол |
|------------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| 0,20 | 0,21 | 105,11 | 50–120 | Молоко/ Хлорамфеникол |
| | 0,21 | 105,10 | | Молочная продукция/ Хлорамфеникол |
| 0,30 | 0,30 | 100,02 | | Молоко/ Хлорамфеникол |
| | 0,33 | 110,11 | | Молочная продукция/ Хлорамфеникол |
| 0,45 | 0,39 | 86,90 | | Молоко/ Хлорамфеникол |
| | 0,40 | 88,90 | | Молочная продукция/ Хлорамфеникол |
| 50,00 | 45,59 | 91,21 | 80–110 | Молоко/Флорфеникол |
| | 44,37 | 88,70 | | Молоко/ Флорфеникол амин |
| | 51,54 | 103,12 | | Молочная продукция/ Флорфеникол |
| | 44,37 | 88,71 | | Молочная продукция/ Флорфеникол амин |
| 100,0 | 102,84 | 102,82 | 80–110 | Молоко/Флорфеникол |
| | 94,72 | 94,71 | | Молоко/ Флорфеникол амин |
| | 97,83 | 97,81 | | Молочная продукция/ Флорфеникол |
| | 96,27 | 96,31 | | Молочная продукция/ Флорфеникол амин |

Продолжение таблицы 4.3.4

| Уровень концентрации, мкг/кг | Хср., мкг/кг | Среднее значение восстановления, % | Допустимое значение, % | Матрица/амфеникол |
|------------------------------|--------------|------------------------------------|------------------------|---|
| 150,0 | 144,45 | 96,31 | 80–110 | Молоко/Флорфеникол |
| | 140,30 | 93,50 | | Молоко/ Флорфеникол амин |
| | 145,61 | 97,10 | | Молочная продукция/ Флорфеникол |
| | 153,55 | 102,41 | | Молочная продукция/ Флорфеникол амин |

Далее исследовали сходимость методики. Ее определяли по результатам, полученным в одинаковых условиях: один исследователь, одно и то же аналитическое оборудование, один и тот же набор используемых реактивов. Определяли среднюю концентрацию, стандартное отклонение и коэффициент вариации (%) обогащенных проб. Критерием оценки повторяемости служит коэффициент вариации (RSD_r , %), значение которого должно соответствовать 2002/657/ЕС:

$$RSD_r \leq 0,67 \times RSD_R \quad (4.3.1)$$

где RSD_R – межлабораторный коэффициент вариации, %, определяемый с помощью уравнения Гурвица по формуле:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (4.3.2)$$

где C – массовая доля, выраженная в степени (экспоненте) 10.

Результаты шести параллельно проводимых испытаний обогащённых проб антибиотиками группы амфениколы представлены в таблице 4.3.5.

Таблица 4.3.5 – Оценка сходимости метода

| Уровень концентрации, мкг/кг | $X_{ср.}$, мкг/кг | $\sigma_{гл.}$, мкг/кг | RSD, % | Матрица/амфеникол |
|------------------------------|--------------------|-------------------------|--------|---|
| 0,20 | 0,21 | 0,01 | 3,70 | Молоко/Хлорамфеникол |
| | 0,21 | 0,01 | 4,00 | Молочная продукция/ Хлорамфеникол |
| 0,30 | 0,30 | 0,01 | 9,10 | Молоко/Хлорамфеникол |
| | 0,33 | 0,00 | 2,30 | Молочная продукция/ Хлорамфеникол |
| 0,45 | 0,39 | 0,01 | 9,90 | Молоко/Хлорамфеникол |
| | 0,40 | 0,01 | 8,00 | Молочная продукция/ Хлорамфеникол |
| 50,0 | 52,15 | 0,55 | 2,90 | Молоко/Флорфеникол |
| | 45,59 | 0,59 | 3,60 | Молоко/Флорфеникол амин |
| | 51,54 | 0,63 | 3,40 | Молочная продукция/ Флорфеникол |
| | 44,37 | 0,69 | 4,30 | Молочная продукция/ Флорфеникол амин |
| 100,0 | 102,84 | 0,92 | 2,50 | Молоко/Флорфеникол |
| | 94,72 | 1,49 | 4,40 | Молоко/Флорфеникол амин |
| | 97,83 | 1,59 | 4,50 | Молочная продукция/ Флорфеникол |
| | 96,27 | 0,98 | 2,80 | Молочная продукция/ Флорфеникол амин |
| 150,0 | 144,45 | 1,33 | 2,60 | Молоко/Флорфеникол |
| | 140,30 | 2,12 | 4,20 | Молоко/Флорфеникол амин |
| | 145,61 | 0,85 | 1,60 | Молочная продукция/ Флорфеникол |
| | 153,55 | 1,86 | 3,40 | Молочная продукция/ Флорфеникол амин |

В соответствии с 2002/657/ЕС относительное стандартное отклонение полученных результатов не превышает установленных значений и отвечает требованиям к методикам [99].

В рамках одной аналитической лаборатории определяли внутрилабораторную прецизионность методики. На одном аналитическом оборудовании два оператора в разные дни осуществляли проводимые испытания. Результаты представлены в таблице 4.3.6.

Таблица 4.3.6 – Оценка промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности

| Оператор | День | Средний результат анализа за 1 день, мкг/мл | Средний результат, мкг/мл | Стандартное отклонение, $\sigma_{\text{гл}}$, мкг/мл | Относительное стандартное отклонение, RSD, % |
|---|------|---|---------------------------|---|--|
| Хлорамфеникол/молоко, C = 0,30 мкг/кг | | | | | |
| Оператор 1 | 1 | 0,29 | 0,27 | 0,01 | 3,33 |
| | 2 | 0,26 | | | |
| | 3 | 0,28 | | | |
| | 4 | 0,27 | | | |
| | 5 | 0,28 | | | |
| | 6 | 0,28 | | | |
| Оператор 2 | 7 | 0,27 | 0,28 | 0,01 | 3,33 |
| | 8 | 0,28 | | | |
| | 9 | 0,28 | | | |
| | 10 | 0,29 | | | |
| | 11 | 0,29 | | | |
| | 12 | 0,29 | | | |
| Хлорамфеникол/молочная продукция, C = 0,30 мкг/кг | | | | | |
| Оператор 1 | 1 | 0,29 | 0,29 | 0,01 | 3,33 |
| | 2 | 0,30 | | | |
| | 3 | 0,30 | | | |
| | 4 | 0,29 | | | |
| | 5 | 0,28 | | | |
| | 6 | 0,28 | | | |
| Оператор 2 | 7 | 0,28 | 0,29 | 0,01 | 3,33 |
| | 8 | 0,30 | | | |
| | 9 | 0,30 | | | |
| | 10 | 0,29 | | | |

Продолжение таблицы 4.3.6

| Оператор | День | Средний результат анализа за 1 день, мкг/мл | Средний результат, мкг/мл | Стандартное отклонение, $\sigma_{\text{гл}}$, мкг/мл | Относительное стандартное отклонение, RSD, % |
|--|------|---|---------------------------|---|--|
| | 11 | 0,29 | | | |
| | 12 | 0,28 | | | |
| Флорфеникол/молоко, C = 100 мкг/мг | | | | | |
| Оператор 1 | 1 | 99,78 | 99,61 | 0,24 | 0,24 |
| | 2 | 99,35 | | | |
| | 3 | 99,35 | | | |
| | 4 | 99,86 | | | |
| | 5 | 99,43 | | | |
| | 6 | 99,82 | | | |
| Оператор 2 | 7 | 99,54 | 99,49 | 0,32 | 0,32 |
| | 8 | 99,45 | | | |
| | 9 | 98,99 | | | |
| | 10 | 98,97 | | | |
| | 11 | 100,00 | | | |
| | 12 | 99,98 | | | |
| Флорфеникол/молочная продукция, C = 100 мкг/мг | | | | | |
| Оператор 1 | 1 | 99,97 | 100,04 | 0,11 | 0,11 |
| | 2 | 100,20 | | | |
| | 3 | 100,10 | | | |
| | 4 | 99,96 | | | |
| | 5 | 99,90 | | | |
| | 6 | 100,10 | | | |
| Оператор 2 | 7 | 100,03 | 99,98 | 0,16 | 0,16 |
| | 8 | 99,89 | | | |
| | 9 | 99,90 | | | |
| | 10 | 100,30 | | | |
| | 11 | 99,89 | | | |
| | 12 | 99,88 | | | |
| Флорфеникол амин/молоко, C = 100 мкг/мг | | | | | |
| Оператор 1 | 1 | 98,97 | 99,01 | 0,09 | 0,09 |
| | 2 | 99,10 | | | |
| | 3 | 98,89 | | | |

Продолжение таблицы 4.3.6

| Оператор | День | Средний результат анализа за 1 день, мкг/мл | Средний результат, мкг/мл | Стандартное отклонение, $\sigma_{\text{гл}}$, мкг/мл | Относительное стандартное отклонение, RSD, % |
|---|------|---|---------------------------|---|--|
| | 4 | 98,95 | | | |
| | 5 | 99,11 | | | |
| | 6 | 99,00 | | | |
| Оператор 2 | 7 | 98,99 | 99,02 | 0,11 | 0,11 |
| | 8 | 98,93 | | | |
| | 9 | 99,19 | | | |
| | 10 | 98,91 | | | |
| | 11 | 99,10 | | | |
| | 12 | 98,99 | | | |
| Флорфеникол амин/молочная продукция, С = 100 мкг/мг | | | | | |
| Оператор 1 | 1 | 98,03 | 98,01 | 0,81 | 0,83 |
| | 2 | 98,12 | | | |
| | 3 | 97,99 | | | |
| | 4 | 98,20 | | | |
| | 5 | 98,10 | | | |
| | 6 | 98,00 | | | |
| Оператор 2 | 7 | 97,99 | 98,06 | 0,83 | 0,85 |
| | 8 | 97,99 | | | |
| | 9 | 98,01 | | | |
| | 10 | 98,11 | | | |
| | 11 | 98,04 | | | |
| | 12 | 98,20 | | | |

Для оценки полученных результатов исследования (таблица 4.3.6) был произведен расчет критерия Фишера. В результате проводимого исследования установлено, что стандартные отклонения результатов анализа, полученных разными операторами, статистически эквивалентны. Средние результаты статистически значимо не отличаются друг от друга ($p < 0,95$). Промежуточная (внутрилабораторная) точность метода удовлетворяет требованиям, предъявляемым к этой валидационной характеристике.

Таким образом, полученные результаты проводимых исследований соответствуют требованиям 2002/657/ЕС, методика является валидированной. Это подтверждает возможность применения предлагаемой методики для определения концентрации антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочной продукции.

4.4 Практические рекомендации применения оптимизированного метода определения антибиотиков группы амфениколы методом ВЭЖХ-МС/МС

Полученные результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что вопрос о содержании антибиотиков группы амфениколы в молоке и молочных продуктах является актуальным.

На основе систематизации и анализа нормативно-правовой базы по контролю антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочных продуктах за последние пять лет были выявлены многочисленные изменения допустимых уровней содержания антибиотиков, которые способствовали обновлению разработок более точных методов исследования [68].

По результатам работы составлена принципиальная схема пробоподготовки проб для контроля остаточного содержания антибиотиков группы амфениколы в молоке и продуктах его переработки при лабораторной диагностике (рисунок 4.4.1).

Оптимизированный метод контроля антибиотиков может быть рекомендован для проведения исследований в научно-исследовательских центрах, отделах контроля качества и в испытательных аккредитованных лабораториях.

На основании результатов диссертационной работы разработаны методические указания «Определение остаточного содержания амфениколов в молоке и молочной продукции с помощью высокоэффективной жидкостной

хроматографии с масс-спектрометрическим детектором» (МУК 05.01-03-05/2022) (ПРИЛОЖЕНИЕ А).

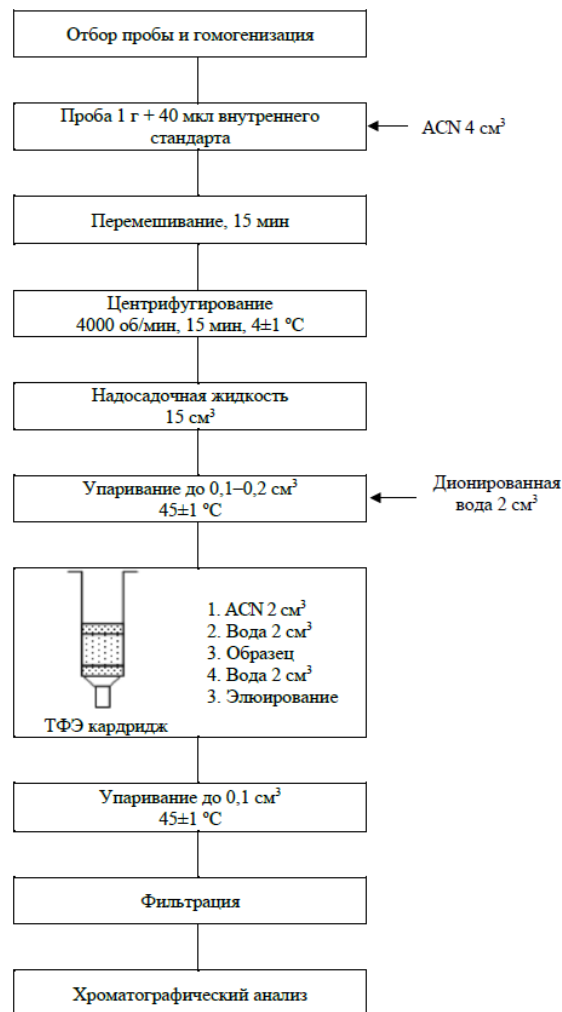


Рисунок 4.4.1 – Принципиальная схема пробоподготовки пробы для контроля антибиотиков амфениколов в молоке и молочной продукции

Оптимизированный метод контроля антибиотиков группы амфениколов прошел верификацию в лаборатории технохимического контроля и арбитражных методов анализа ФГАНУ «ВНИМИ» (г. Москва) и внедрен в ее работу, а также в работу научно-исследовательской лаборатории микробиологии и биотехнологии ОНК «Институт медицины и наук о жизни» ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта» (г. Калининград). Проведена апробация и получены положительные результаты при использовании метода в производственной лаборатории ООО «Южский молочный завод» (г. Южа) (ПРИЛОЖЕНИЕ Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведен мониторинг биобезопасности молочной продукции молокоперерабатывающих предприятий Кемеровской области – Кузбасса по содержанию антибиотиков: в 2018–2022 гг. выявлено 179 положительных результатов на наличие антибиотиков группы амфениколов, что составляет 19 % от общего количества исследуемого материала. Наибольшее количество положительных результатов выявлено в сыром молоке (28 %) и молоке пастеризованном (20 %).

2. Изучено влияние антибиотиков на основные физико-химические показатели, определен характер их дифференциального воздействия на микрофлору сырого молока: наличие антибиотиков с концентрацией 0,0003 мг/кг и более оказывает выраженное влияние на значения титруемой кислотности при 25 ± 2 и 37 ± 2 °С. Антибиотики группы амфениколы оказывают негативное влияние на развитие микрофлоры сырого молока. Хлорамфеникол проявляет способность ингибировать жизнедеятельность бактерии группы КМАФАнМ и молочнокислых бактерий в среднем на 30 % больше, чем антибиотики флорфеникол и флорфеникол амин.

3. Определен ингибирующий потенциал антибиотиков амфениколов в метаболических процессах заквасочных культур *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Lactobacillus casei* молочнокислых бактерий на уровне ПДК: концентрации антибиотика 0,0003 мг/кг и более оказали влияние на содержание лактозы и снижение значений титруемой кислотности, что привело к увеличению продолжительности образования сгустка в опытных образцах.

4. Изучено влияние антибиотика хлорамфеникола на биобезопасность готовой кисломолочной продукции: наличие антибиотика в молоке отразилось на органолептических, физико-химических и микробиологических показателях йогурта. Полученные в ходе исследования опытные образцы йогурта не соответствуют основным показателям безопасности согласно требованиям ГОСТ Р 51331-99 «Продукты молочные. Йогурты. Общие технические условия», ТР ТС 033/2013 «О

безопасности молока и молочной продукции» и ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

5. Определены оптимальные масс-спектрометрические параметры детектирования антибиотиков группы амфениколов. Подобраны оптимальные значения напряжения на фрагментаторе (хлорамфеникол – 85 В, флорфеникол – 95 В, флорфеникол амин – 80 В). Установлены оптимальные значения энергий соударений. Установлены оптимальные условия хроматографического разделения антибиотиков группы амфениколов. Рекомендованный состав подвижной фазы – 0,1 % раствора муравьиной кислоты.

6. Доказано, что оптимизированный метод превосходит метод, описанный в ГОСТ 54904. Оптимизация метода определения амфениколов в молоке и молочных продуктах позволила добиться снижения предела определения до 0,15 мкг/кг для хлорамфеникола. Проведена валидация оптимизированного метода согласно требованиям ОФС.1.1.0012.15 и Решению Комиссии 2002/657/ЕС.

7. Проведена апробация и получены положительные результаты при использовании оптимизированного метода контроля антибиотиков группы амфениколов в практике производственной лаборатории ООО «Южский молочный завод» (г. Южа), испытательной лаборатории «Молоко» ФГБНУ ВНИМИ (г. Москва) и научно-исследовательской лаборатории «Лаборатория микробиологии и биотехнологий» ФГАОУ ВО «БФУ им. И. Канта» (г. Калининград).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаптация системы ISO 22000:2007 (ХАССП) в производстве инновационного творожного продукта / В. В. Крючкова, И. Ф. Горлов, М. И. Сложенкина [и др.] // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2023. – № 1. – С. 9–16. <https://doi.org/10.31857/2500-2082/2023/1/9-16>

2. Амелин, В. Г. Одновременное определение остаточного количества хлорамфеникола и хлорамфеникола пальмитата в пищевых продуктах с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии / В. Г. Амелин, Д. С. Большаков // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т. 61, № 6. – С. 420–428.

3. Амелин, В. Г. Особенности определения остаточных количеств амфениколов в пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения / В. Г. Амелин, А. М. Мухрыгина, А. И. Коротков // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2017. – Т. 58, № 5. – С. 250–259.

4. Анализ сыропригодности молочного сырья и качества обогащённых сырных продуктов / И. Ф. Горлов, М. И. Сложенкина, С. Е. Божкова [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – 2020. – № 3. – С. 258–267. <https://doi.org/10.32786/2071-9485-2020-03-27>

5. Андрейчикова, А. А. Проблемы качества и безопасности кисломолочных напитков / А. А. Андрейчикова, Н. И. Дунченко // Безопасность и качество сельскохозяйственного сырья и продовольствия. Управление «зелёными» навыками в пищевой промышленности: Материалы IV Международной научно-практической конференции, посвященной 20-летию кафедры «Управление качеством и товароведение продукции». Проводится в рамках реализации международной программы SUSDEV. – Москва : Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева, 2020. – С. 148–150.

6. Андриянова, Э. М. Проблема контроля за содержанием антибиотиков в

продукции животноводства и методы их снижения / Э. М. Андриянова, А. А. Башаров // Проблемы интенсивного развития животноводства и их решение: Сборник научных трудов международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Брянск : Брянский государственный аграрный университет, 2022. – С. 403–406.

7. Антонова, А. Н. Сравнительная оценка эффективности способов изучения антибиотикорезистентности микроорганизмов / А. Н. Антонова, Е. М. Ленченко // Ветеринария и кормление. – 2015. – № 6. – С. 34–37.

8. Безопасность и качество молока-сырья для производства молока питьевого стерилизованного / В. С. Янковская, Н. И. Дунченко, С. В. Купцова [и др.] // Молочная промышленность. – 2021. – № 9. – С. 57–59. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2021-09-57-59>

9. Белка, М. В. Современное состояние проблемы загрязнения почв антибиотиками и методы их санации / М. В. Белка, Ю. В. Акименко // Актуальные проблемы экологии и природопользования / отв. ред. К. Ш. Казеев. – Ростов-на-Дону, Таганрог : Южный федеральный университет, 2020. – С. 16–19.

10. Белякова, З. Ю. Молочная продукция: проектирование системы прослеживаемости / З. Ю. Белякова, И. А. Макеева // Контроль качества продукции. – 2018. – № 1. – С. 13–16.

11. Белякова, З. Ю. Новые методики контроля показателей безопасности продуктов на молочной основе / З. Ю. Белякова, И. А. Макеева // Переработка молока. – 2018. – № 4. – С. 6–9.

12. Бухарев, А. Г. Исследование качественных показателей нового вида творожного продукта / А. Г. Бухарев, Н. Б. Гаврилова, Н. Л. Чернопольская // Актуальные направления научных исследований: технологии, качество и безопасность: Сборник материалов II Национальной (Всероссийской) конференции ученых в рамках III международного симпозиума «Инновации в пищевой биотехнологии». – Кемерово : Кемеровский государственный университет, 2021. – С. 41–43.

13. Бухарев, А. Г. Современный подход к определению качества, безопасности

и срока годности нового вида творожного продукта / А. Г. Бухарев, Н. Б. Гаврилова // Рынок Фуднет: актуальные проблемы, перспективы и решения: Материалы Международной научно-практической конференции посвящённой 90-летию юбилею кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии. – Омск : Омский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина, 2021. – С. 9–11.

14. Буянова И. В. Технология молока и молочных продуктов. Производственный учет и отчетность в молочной отрасли : учебное пособие / И. В. Буянова. – 2-е изд. – Кемерово : Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2014. – 159 с.

15. Буянова, И. В. Опасность стафилококковых инфекций в пищевых продуктах / И. В. Буянова, С. С. Голубева // Экологические чтения-2021: XII Национальная научно-практическая конференция с международным участием. – Омск : Омский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина, 2021. – С. 107–110.

16. Буянова, И. В. Роль пробиотических микроорганизмов в создании функциональных кисломолочных напитков / И. В. Буянова, В. А. Ураева // Актуальные вопросы переработки и формирование качества продукции АПК: Материалы международной научной конференции. – Красноярск : Красноярский государственный аграрный университет, 2021. – С. 31–34.

17. Взаимодействие катионных пептидных аналогов хлорамфеникола с рибосомой / З. З. Хайруллина, А. Г. Терещенков, С. А. Завьялова [и др.] // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 11. – С. 1701–1717.
<https://doi.org/10.31857/S0320972520110123>

18. Влияние акустической кавитации на микроструктуру сыра «Адыгейский» из коровьего и козьего молока / Н. И. Дунченко, О. Н. Красуля, Е. С. Волошина [и др.] // Сыроделие и маслоделие. – 2022. – № 5. – С. 22–24.
<https://doi.org/10.31515/2073-4018-2022-5-22-24>

19. Влияние антибиотиков на качество и безопасность молока и молочных продуктов / Г. В. Родионов, О. В. Селицкая, Н. М. Костомахин [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 4. – С. 88–103.

<https://doi.org/10.34677/0021-342-2019-4-88-103>

20. Влияние замораживания на качество дефростированного сгущенного молока-сырья / С. Н. Туровская, А. Г. Галстян, И. А. Радаева [и др.] // Переработка молока. – 2018. – № 3. – С. 28–29.

21. Влияние новой пребиотической кормовой добавки на качество и безопасность молока-сырья коз зааненской породы / М. И. Сложенкина, С. А. Брехова, Н. А. Ткаченко [и др.] // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – 2022. – № 3. – С. 318–327. <https://doi.org/10.32786/2071-9485-2022-03-36>

22. Влияние разных агроэкологических условий юга России на качественные показатели молока-сырья / И. Ф. Горлов, М. И. Сложенкина, О. Ю. Мишина [и др.] // Юг России: экология, развитие. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 114–125.

23. Влияние растительных наполнителей на качество и хранимоспособность кисломолочного продукта / В. В. Крючкова, С. Н. Белик, И. Ф. Горлов [и др.] // Пищевая промышленность. – 2020. – № 1. – С. 50–55. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10009>.

24. Воздействие антибиотиков на развитие микроорганизмов молока / О. В. Селицкая, А. П. Олесюк, Г. В. Родионов [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 1. – С. 105–121. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-1-105-121>

25. Возможности восстановления антимикробных свойств антибиотиков против резистентных штаммов / Е. А. Бенденко, Е. И. Кошель, У. С. Александровна [и др.] // Естественные науки и медицина: теория и практика: Сборник статей по материалам II-IV международной научно-практической конференции. Том 2–4 (2). – Новосибирск : Ассоциация научных сотрудников «Сибирская академическая книга», 2018. – С. 17–21.

26. Волкова, Г. С. Изучение производственных свойств отдельных штаммов молочнокислых бактерий для создания пробиотиков / Г. С. Волкова, Е. В. Куксова, Е. М. Сербя // Пищевая промышленность. – 2020. – № 3. – С. 8–11. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2020-10024>.

27. Гаврилов, Г. Б. Определение триптофана в молоке методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза / Г. Б. Гаврилов, А. А. Филиппов, А. С. Петров // Инновационное развитие аграрно-пищевых технологий: Материалы международной научно-практической конференции. – Волгоград : Общество с ограниченной ответственностью «СФЕРА», 2021. – С. 14–16.

28. Гаврилова, Н. Б. Козье молоко – биологически полноценное сырьё для специализированной пищевой продукции / Н. Б. Гаврилова, Е. М. Щетинина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2019. – № 1. – С. 66–75.

29. Галкин, А. В. О выявлении возбудителей мастита и их чувствительности к антибиотикам / А. В. Галкин, Е. Трепалина // Эффективное животноводство. – 2017. – № 7. – С. 22–23.

30. Ганина, В. И. Влияние ультразвуковой обработки и лазерного облучения на показатели качества молочного сырья / В. И. Ганина, И. Д. Мурашов, В. В. Морозова // Молочная промышленность. – 2016. – № 9. – С. 22–23.

31. Ганина, В. И. Микробиологическая безопасность молочного сырья и продуктов его переработки / В. И. Ганина // Молочная промышленность. – 2016. – № 5. – С. 35.

32. Ганина, В. И. Микробиологические показатели готовой молочной продукции / В. И. Ганина // Молочная промышленность. – 2016. – № 12. – С. 46.

33. Ганина, В. И. Микробиологический контроль питьевого молока и сливок / В. И. Ганина // Молочная промышленность. – 2017. – № 2. – С. 40.

34. Ганина, В. И. Производственный контроль молочной продукции : учебник / В. И. Ганина, Л. А. Борисова, В. В. Морозова. – 2-е изд. Москва : Инфра-М, 2023. – 256 с.

35. Гармашов, С. Ю. Использование метода ВЭЖХ-МС/МС для определения антибиотиков группы амфениколов в продукции животноводства / С. Ю. Гармашов, О. С. Чаплыгина // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2021. – Т. 10, № 2. – С. 113–117. <https://doi.org/10.46548/21vek-2021-1054-0021>.

36. Гиро, Т. М. Влияние кормовых микотоксикозов на фоне нарушенного минерального обмена на содержание витаминов, макро- и микроэлементов в молоке / Т. М. Гиро, О. М. Попова // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2012. – № 1. – С. 43–47.

37. Глухарева, Т. В. Основы получения и применения антибиотиков : учебное пособие для студентов вуза / Т. В. Глухарева, И. С. Селезнева, Е. Н. Уломский. – Екатеринбург : Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, 2021. – 150 с.

38. Горбатова, К. К. Биохимия молока и молочных продуктов : учебное пособие для вузов / К. К. Горбатова. Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1997. – 344 с.

39. Горбатова, К. К. Влияние тепловой обработки на состав молока / К. К. Горбатова // Переработка молока. – 2003. – № 6. – С. 14–15.

40. ГОСТ 25228-82. Молоко и сливки. Метод определения термоустойчивости по алкогольной пробе. Москва : Стандартинформ, 2004. – 4 с.

41. ГОСТ 26669-85. Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. Москва : Стандартинформ, 2010. – 10 с.

42. ГОСТ 31449-2013. Молоко коровье сырое. Технические условия. Москва : Стандартинформ, 2019. – 8 с.

43. ГОСТ 31981-2013. Йогурты. Общие технические условия. Москва : Стандартинформ, 2014. – 12 с.

44. ГОСТ 32901-2014. Молоко и молочная продукция. Методы микробиологического анализа. Москва : Стандартинформ, 2015. – 28 с.

45. ГОСТ 34304-2017. Молоко и молочные продукты. Метод определения лактозы и галактозы. Москва : Стандартинформ, 2018. – 13 с.

46. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. Москва : Стандартинформ, 2009. – 8 с.

47. ГОСТ 8218-89. Молоко. Метод определения чистоты. Москва : Стандартинформ, 2009. – 5 с.

48. ГОСТ Р 54758-2011. Молоко и продукты переработки молока. Методы

определения плотности. Москва : Стандартинформ, 2012. – 16 с.

49. ГОСТ Р 54904-2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Москва : Стандартинформ, 2013. – 22 с.

50. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14> (дата обращения: 03.04.2021).

51. Жестянова, Л. В. Мясная продуктивность утят при скармливании комбикормов с ферментными препаратами / Л. В. Жестянова, А. Ю. Лаврентьев // Перспективные технологии и инновации в АПК в условиях цифровизации: Материалы Международной научно-практической конференции. – Чебоксары : Чувашский государственный аграрный университет, 2022. – С. 234–236.

52. Зырянов, С. К. Рациональная антибиотикотерапия и фармакология бета-лактамов антибиотиков / С. К. Зырянов, О. И. Бутранова, Е. А. Байбулатова. – Москва : Российский университет дружбы народов, 2022. – 217 с.

53. Зырянов, С. К. Хлорамфеникол: новые возможности старого препарата / С. К. Зырянов, О. И. Бутранова, М. С. Ченкуров // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 11. – С. 81–94. <https://doi.org/10.18565/aig.2021.11.81-94>

54. Иммунохроматографическая тест-полоска для проведения экспресс-метода определения четырех групп антибиотиков в молоке с исключением возможной фальсификации образца: пат. 191660U1 Рос. Федерация. № 2019104908 / Щукин А. Б.; заявл. 21.02.2019; опубл. 15.08.2019, Бюл. № 23. 9 с.

55. Индикация антибиотика цинкбацитрацина в кормах методом ВЭЖХ / Г. Г. Галяутдинова, А. В. Маланьев, А. Г. Мухамметшина [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2020. – Т. 242, № 2. – С. 36–40. <https://doi.org/10.31588/2413-4201-1883-242-2-36-40>.

56. Индукция *in vitro* трансмиссивной устойчивости к тетрациклину, хлорамфениколу и ампициллину у культур *Vibrio cholerae* не O1/ не 0139

серогрупп, выделенных в 1990–2005 гг. / Н. А. Селянская, И. В. Рыжко, Л. М. Веркина [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т. 56, № 7–8. – С. 16–21.

57. Инихов, Г. С. Биохимия молока и молочных продуктов : учебник для техникумов молочной промышленности / Г. С. Инихов. – 3-е изд. – Москва: Пищевая промышленность, 1970. – 317 с.

58. Исследование микроструктуры сухого молока разных видов животных / С. Е. Димитриева, Г. М. Лесь, Т. М. Гиро [и др.] // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 8. – С. 41–44.

59. Каган, Я. Р. О фагоустойчивости микроорганизмов / Я. Р. Каган, А. А. Майоров // Сыроделие и маслоделие. – 2020. – № 6. – С. 36–38.
<https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-6-36-38>

60. Караоглу, З. Почему важно использовать тест-системы для обнаружения антибиотиков в молоке / З. Караоглу, Е. Соловьева // Молочная промышленность. – 2021. – № 5. – С. 12–13.

61. Кручинин А. Антибиотики vs Бактерии. «Война Бесконечности» или всему есть предел? – URL: <https://biomolecula.ru/articles/antibiotiki-vs-bakterii-voina-beskonechnosti-ili-vsemu-est-predel> (дата обращения: 11.12.2021).

62. Крысанов, Ю. И. Остаточные количества антибиотиков в молоке-сырье – актуальная проблема для молокоперерабатывающих предприятий / Ю. И. Крысанова // Пищевая промышленность. – 2021. – № 7. – С. 64–66.
<https://doi.org/10.52653/PPI.2021.7.7.012>

63. Курушкина, П. А. Определение антибиотиков в молочных продуктах, реализуемых в г. Туле и Тульской области / П. А. Курушкина, Н. Д. Стемпинь // Молодой ученый: вызовы и перспективы: Сборник статей по материалам X международной научно-практической конференции. Т. № 8 (10). – Москва : Общество с ограниченной ответственностью «Интернаука», 2016. – С. 232–236.

64. Логинов, В. А. Анализ качества молока в хозяйствах различного типа / В. А. Логинов, А. А. Майоров, Н. М. Сурай // Молочная река. – 2019. – № 1. – С. 48–50.

65. Маилян Э. Антибиотики в животноводстве. Как снизить использование противомикробных препаратов в отрасли. – URL:

<https://www.agroinvestor.ru/technologies/article/37842-antibiotiki-v-zhivotnovodstve-kak-snizit-ispolzovanie-protivomikrobnnykh-preparatov-v-otrasli> (дата обращения: 13.11.2020).

66. Майкова, Д. Н. Определение остаточных количеств антибиотиков в молоке, реализуемого на рынке г. Москвы / Д. Н. Майкова, Н. А. Малофеева // Неделя студенческой науки: Материалы Всероссийской студенческой научно-практической конференции. – Москва : Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина, 2022. – С. 270–272.

67. Макеева, И. А. Создание методологии совершенствования нормативной базы молочной отрасли (ретроспектива, реальность, перспективы) / И. А. Макеева // Идеи академика Владимира Дмитриевича Харитонов в наукоемких технологиях переработки молока / отв. ред. А. Г. Галстян. – Москва : Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, 2021. – С. 172–186. <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-6-3>

68. Малинина, З. Ю. Повышение эффективности процедуры контроля антибиотиков в молоке и молочных продуктах: дис. ... канд. тех. наук: 05.02.23. Москва, 2013. – 130 с.

69. Машковский, М. Д. Лекарственные средства : пособие для врачей / М. Д. Машковский. – Москва : Новая волна, 2017. – 1216 с.

70. МВИ.2007.24.01/2. Методика выполнения измерений показателей качества молока и других молочных продуктов на ультразвуковых анализаторах молока «Клевер-2» и «Клевер-2М». – Новосибирск, 2009. – 12 с.

71. Миронова, Н. Н. Методы определения антибиотиков в молоке / Н. Н. Миронова // Наука и инновации в АПК XXI века: Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 145-летию академии. – Казань : Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана, 2018. – С. 241–244.

72. Мониторинг контаминации животноводческой продукции остаточными количествами антибиотиков / Е. Б. Шакибаев, З. А. Латыпова, Ш.

Т. Сарбаканова [и др.] // Актуальные научные исследования в современном мире. – 2020. – № 11–3. – С. 156–163.

73. Муминова, М. С. Антибиотики вчера и сегодня / М. С. Муминова // Научное сообщество студентов. Междисциплинарные исследования: Электронный сборник статей по материалам X студенческой международной научно-практической конференции. Том № 7 (10). – Санкт-Петербург : Ассоциация научных сотрудников «Сибирская академическая книга», 2016. – С. 207–214.

74. Научно-экспериментальное обоснование безопасности биотехнологической продукции для пищевой промышленности / Л. В. Римарева, Е. М. Серба, М. Б. Оверченко [и др.] // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2019. – № 1. – С. 40–43. <https://doi.org/10.30850/vrsn/2019/1/40-43>

75. Никифорова, А. П. Изучение пробиотического потенциала штаммов молочнокислых бактерий *Latilactobacillus sakei* / А. П. Никифорова, И. С. Хамагаева // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2022. – Т. 10, № 2. – С. 15–21. <https://doi.org/10.14529/food220202>.

76. Никифорова, А. П. Изучение процесса ферментации байкальского омуля с применением молочнокислых бактерий / А. П. Никифорова, С. Н. Хазагаева, И. С. Хамагаева // Вестник Камчатского государственного технического университета. – 2021. – № 55. – С. 17–28. <https://doi.org/10.17217/2079-0333-2021-55-17-28>.

77. Нормирование антибиотиков в молоке: позиция Россельхознадзора // Молочная промышленность. – 2020. – № 4. – С. 12–13.

78. Окислительный метаболизм белков крови при длительном воздействии свинца в условиях применения хлорамфеникола и биофеникола / Н. Ж. Орманов, Ж. Ж. Кулбалиева, М. К. Ширинова [и др.] // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2015. – № 2. – С. 521–523.

79. Олесюк, А. П. Влияние антибиотиков и электромагнитного излучения на химический состав и микробиологические показатели молочных продуктов / А. П. Олесюк // Доклады ТСХА. Выпуск 292, Часть IV. Москва : Российский

государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева, 2020. – С. 452–456.

80. Олесюк, А. П. Влияние антибиотиков на показатели качества молока-сырья / А. П. Олесюк // Доклады ТСХА. Выпуск 291, Часть V. – Москва : Калужский филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева», 2019. – С. 247–250.

81. Олесюк, А. П. Влияние антибиотиков на физико-химические и технологические свойства заквасок *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* / А. П. Олесюк // Материалы международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 150-летию со дня рождения В. П. Горячкина. Москва : Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К. А. Тимирязева, 2018. – С. 54–58.

82. Олесюк, А. П. Качество и безопасность молока и молочных продуктов в зависимости от ингибиторов микроорганизмов: дис. ... канд. биол. наук: 06.02.10. Москва, 2019. – 164 с.

83. Определение физико-химических показателей, содержание некоторых макро- и микроэлементов в молоке коров, больных бруцеллезом / С. Ю. Веселовский, Т. М. Гиро, О. М. Попова [и др.] // Вестник ВСГУТУ. – 2020. – № 1. – С. 5–10.

84. Определение физико-химических характеристик хлорамфеникола различных производителей / П. Л. Юлышева, В. В. Заиченко, А. Д. Изосимова [и др.] // Семьдесят вторая всероссийская научно-техническая конференция студентов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений с международным участием: Сборник материалов конференции. Часть 1. Ярославль : Ярославский государственный технический университет, 2019. – С. 162–164.

85. Основные этапы проектирования системы прослеживаемости при производстве кисломолочных продуктов / Н. И. Дунченко, С. В. Купцова, Т. И. Аникиенко [и др.] // Молочная промышленность. – 2022. – № 11. – С. 31–34.
<https://doi.org/10.31515/1019-8946-2022-11-31-34>

86. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. – URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik> (дата обращения: 05.05.2022).

87. Оценка биологической безопасности молочных продуктов, содержащих антибиотики / О. С. Чаплыгина, О. В. Козлова, М. Ю. Жарко [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2023. – Т. 53, № 1. – С. 192–201. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2427>

88. Пломодьялов, Д. Эффективность флорфеникола в лечении цыплят / Д. Пломодьялов // Животноводство России. – 2019. – № 10. – С. 44–45.

89. По следам антибиотиков: что могло пойти не так и как это исправить? – URL: <https://biomolecula.ru/articles/po-sledam-antibiotikov-chto-moglo-poiti-ne-tak-i-kak-eto-ispravit> (дата обращения: 21.03.2021).

90. Посконная, Т. Ф. Мониторинг левомецетина (хлорамфеникол) в мясе, мясопродуктах и рыбе импортного и отечественного производства / Т. Ф. Посконная // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2011. – № 2. – С. 17–20.

91. Потехин, А. В. Мониторинг антибиотикорезистентности изолятов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012–2014 гг. / А. В. Потехин, В. С. Русалеев // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1. – С. 24–29.

92. Потороко, И. Ю. Особенности контроля качества молочной продукции в условиях действия технических регламентов / И. Ю. Потороко, В. В. Ботвинникова, Н. В. Попова // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Экономика и менеджмент. – 2008. – № 30. – С. 91–97.

93. Потороко, И. Ю. Современные подходы к развитию инновационных технологий в пищевой отрасли: проблемы, решения, перспективы / И. Ю. Потороко, В. В. Ботвинникова, Р. И. Фаткуллин // Товаровед продовольственных товаров. – 2013. – № 6. – С. 44–46.

94. Прижизненное формирование состава и свойств животного сырья / А. Б. Лисицын, И. М. Чернуха, О. И. Лунина [и др.]. – Москва: Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, 2018. – 440 с.

95. Принципы обеспечения качества отечественного сухого молока / И. А. Радаева, Е. Е. Илларионова, С. Н. Туровская [и др.] // Пищевая промышленность. – 2019. – № 9. – С. 54–57. <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10145>
96. Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных / А. Н. Панин, А. А. Комаров, А. В. Куликовский [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2017. – № 5. – С. 18–24.
97. Просеков, А. Ю. Инновационный менеджмент биотехнологий заквасочных культур / А. Ю. Просеков, Л. А. Остроумов // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 43, № 4. – С. 64–69.
98. Разгонова, М. П. Исследование сверхкритических CO₂-экстрактов багульника болотного *Ledum palustre* L. (*Rhododendron tomentosum* Harmaja) и идентификация его метаболитов методом тандемной масс-спектрометрии / М. П. Разгонова, А. М. Захаренко, К. С. Голохваст // Химия растительного сырья. – 2022. – № 1. – С. 179–191. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2022019506>
99. Решение комиссии от 14 августа 2002 года, вводящее в действие Директиву Совета 96/23/ЕС о проведении аналитических методов и толковании результатов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/560448582> (дата обращения: 14.05.2022).
100. Роль низких температур в оценке микробиологического состояния замороженных сыров / И. В. Буянова, О. В. Кригер, И. О. Ларина [и др.] // Сыроделие и маслоделие. – 2008. – № 3. – С. 25–26.
101. Рыщанова, Р. М. Мониторинг степени загрязнения молока остаточными количествами антибиотиков производителей Костанайской области / Р. М. Рыщанова, С. К. Коканов, В. В. Паламарчук // Сельскохозяйственные технологии. – 2019. – Т. 1, № 1. – С. 33–41.
102. Свириденко, Г. М. Оценка биологического метода контроля ингибирующих веществ для выявления допустимого уровня содержания антибиотиков в молоке / Г. М. Свириденко, Т. В. Комарова // От истоков к современности: Сборник материалов Международной Недели сыроделия и маслоделия, посвященной 70-летию ВНИИМС. – Углич : Всероссийский научно-

исследовательский институт сыроделия и маслоделия, 2014. – С. 267–272.

103. Свириденко, Г. М. Проблемы организации системного контроля антибиотиков в молоке и молочных продуктах / Г. М. Свириденко // Молочная промышленность. – 2020. – № 8. – С. 8–12. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-08-8-12>.

104. Свириденко, Г. М. Развитие и метаболизм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* при различных технологических приемах производства созревающих сыров / Г. М. Свириденко, О. М. Шухалова // Молочная промышленность. – 2022. – № 8. – С. 36–38. <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2022-08-36-38>.

105. Свириденко, Г. М. Сравнительная оценка чувствительности тест-культур *Streptococcus thermophilus* и *Bacillus thermophilus* к наличию ингибиторов бактериального роста в молоке / Г. М. Свириденко, М. Б. Захарова, Т. В. Комарова // Научно-практические решения и вопросы технического регулирования производства молочной продукции: Сборник материалов Международной молочной недели. – Углич : Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, 2017. – С. 157–161.

106. Скрининг полифенольного состава амурского винограда *Vitis amurensis* Rupr и его идентификация методом тандемной масс-спектрометрии / М. П. Разгонова, А. Ш. Сабитов, Е. В. Перминова [и др.] // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2021. – Т. 23, № 4. – С. 393–404. <https://doi.org/10.35547/IM.2021.23.4.015>.

107. Современные подходы к хранению и эффективной переработке сельскохозяйственной продукции для получения высококачественных пищевых продуктов / А. Г. Галстян, Л. М. Аксёнова, А. Б. Лисицын [и др.] // Вестник Российской академии наук. – 2019. – Т. 89, № 5. – С. 539–542. <https://doi.org/10.31857/S0869-5873895539-542>.

108. Соколова, О. В. Рассуждения на тему ужесточения контроля показателей безопасности молока в части контроля антибиотиков / Соколова О. В. // Переработка молока. – 2021. – № 11. – С. 24–25.

109. Сорбция амфениколов на магнитном сверхсшитом полистироле / В. В.

Толмачева, В. Ю. Савинова, Н. О. Гончаров [и др.] // Журнал физической химии. – 2022. – Т. 96, № 6. – С. 875–879. <https://doi.org/10.31857/S0044453722060279>

110. Спектральные и протоноакцепторные свойства хлорамфеникола / О. К. Базыль, Е. Н. Бочарникова, О. Н. Чайковская [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2022. – Т. 130, № 11. – С. 1638–1645. <https://doi.org/10.21883/OS.2022.11.53768.3721-22>.

111. Способ определения антибиотиков в сыром молоке: пат. 2757226С1 Рос. Федерация. № 2021101604 / Дю И. С.-С.; заявл. 26.01.2021; опубл. 12.10.2021, Бюл. № 29. 10 с.

112. Способ определения левомицетина в кормах животного происхождения с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии: пат. 2633013С2 Рос. Федерация. № 2016109528 / Герунова Л. К., Шитлина А. И., Темерова Е. В. [и др.]; заявл. 16.03.2016; опубл. 11.10.2017, Бюл. № 26. 7 с.

113. Способ получения бактериального концентрата бифидобактерий в жидкой форме: пат. 2540022С2 Рос. Федерация. № 2013120619/10 / Хамагаева И. С., Замбалова Н. А.; заявл. 06.05.2013; опубл. 27.01.2015, Бюл. № 3. 16 с.

114. Способ получения микрокапсул хлорамфеникола (левомицетина): пат. 2731854С1 Рос. Федерация. № 2020109614 / Кролевец А. А.; заявл. 04.03.2020; опубл. 08.09.2020, Бюл. № 25. 5 с.

115. Степанова, В. Исследование природных и синтетических антибиотиков / В. Степанова, И. А. Шаманаева // М. В. Ломоносов – наш первый университет: Сборник статей по материалам регионального конкурса исследовательских работ. – Волгоград : Волгоградский государственный технический университет, 2018. – С. 31–37.

116. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года : распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.06.2016 №1364 -р.

117. Технический регламент Таможенного союза (ТР ТС 021/2011) «О безопасности пищевой продукции». – URL: <https://docs.cntd.ru/document/902320560> (дата обращения: 16.04.2022).

118. Технический регламент Таможенного союза (ТР ТС 033/2013) «О безопасности молока и молочной продукции». – URL: <https://docs.cntd.ru/document/499050562> (дата обращения: 16.04.2022).

119. Типы хозяйств и качество молока: проблемы и их решения / А. Е. Шеншин, А. А. Майоров, Н. М. Сурай [и др.] // Экономические науки. – 2019. – № 175. – С. 102–106. <https://doi.org/10.14451/1.175.102>

120. Тонко, О. В. Влияние остаточных количеств антибиотиков на возникновение устойчивости у бактерий / О. В. Тонко // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензируемый ежегодный сборник научных трудов. Выпуск 10. – Минск : Белорусский государственный медицинский университет, 2020. – С. 348–355.

121. Топникова, Е. В. ВНИИМС на службе интересов молочной отрасли / Е. В. Топникова, О. В. Лепилкина, Ю. Я. Свириденко // Сборник научных трудов к 75-летию со дня основания ВНИИМС «Научные подходы к решению актуальных вопросов в области переработки молока». – Углич : Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, 2019. – С. 3–6.

122. Топникова, Е. В. Производство молока и молочных продуктов: ожидания, итоги и перспективы / Е. В. Топникова, Ю. Я. Свириденко // Молоко и молочная продукция: актуальные вопросы производства: Материалы международной научно-практической конференции. – Углич : Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, 2018. – С. 6–12.

123. Установление фальсификации жировой фазы молочной продукции жирами растительного происхождения / Г. Б. Гаврилов, А. А. Филиппов, Б. Г. Гаврилов [и др.] // Молочная промышленность. – 2015. – № 8. – С. 34–35.

124. Федорова, М. А. Состояние рынка молока и молочной продукции за рубежом и влияние на него пандемии коронавируса / М. А. Федорова // Проблемы современной аграрной науки: Материалы международной научной конференции. – Красноярск : Красноярский государственный аграрный университет, 2021. – С. 372–375.

125. Хуршудян, С. А. Качество пищевых продуктов. Термины, определения

и противоречия / С. А. Хуршудян, А. Г. Галстян // Контроль качества продукции. – 2018. – № 1. – С. 48–49.

126. Чаплыгина, О. С. Влияние хлорамфеникола на качество кисломолочных продуктов / О. С. Чаплыгина, А. Д. Веснина, А. Ю. Просеков // Новейшие достижения в области медицины, здравоохранения и здоровьесберегающих технологий: Сборник материалов I Международного конгресса. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2022. – С. 489–491. <https://doi.org/10.21603/-I-IC-149>

127. Чаплыгина, О. С. Контроль загрязнения молока и молочной продукции антибиотиками группы амфениколы / О. С. Чаплыгина, В. Ф. Долганюк, Д. Д. Белова // Зоотехническая наука в условиях современных вызовов: Сборник трудов III научно-практической конференции с международным участием. – Киров: Вятский государственный агротехнологический университет, 2021. – С. 149–152.

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

129. Чаплыгина, О. С. Определение остаточного количества антибиотиков в продуктах животного происхождения / О. С. Чаплыгина, А. Ю. Просеков, Д. Д. Белова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2022. – Т. 84, № 1. – С. 140–148. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2022-1-140-148>.

130. Шепелин, И. А. Антибиотики : Справочник бактериолога / И. А. Шепелин, А. Ю. Миронов, К. А. Шепелин. – Москва: ООО «Типография Копиринг», 2018. – 255 с.

131. Шульга, Н. Н. Антибиотики в животноводстве – пути решения проблемы / Н. Н. Шульга, И. С. Шульга, Л. П. Плавшак // Тенденции развития науки и образования. – 2018. – № 35–4. – С. 52–55. <https://doi.org/10.18411/lj-28-02-2018-68>

132. Шульга, Н. Н. Антибиотики против человека / Н. Н. Шульга, И. С. Шульга, Л. П. Плавшак // БИО. – 2019. – № 7. – С. 6–12.

133. Экспертиза молока и молочных продуктов. Качество и безопасность : учебно-справочное пособие / Н. И. Дунченко, А. Г. Храмцов, И. А. Макеева [и др.]. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. – 480 с.

134. A microbiological inhibition method for the rapid, broad-spectrum, and high-throughput screening of 34 antibiotic residues in milk / Q. Wu, Q. Zhu, Y. Liu [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2019. – Vol. 102, № 12. – P. 10825–10837. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16480>

135. A novel colorimetric sandwich aptasensor based on an indirect competitive enzyme-free method for ultrasensitive detection of chloramphenicol / K. Abnous, N. M. Danesh, M. Ramezani [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – Vol. 78. – P. 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.028>

136. A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics / J. V. Pham, M. A. Yilma, A. Feliz [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>

137. A sensitive two-analyte immunochromatographic strip for simultaneously detecting aflatoxin M1 and chloramphenicol in milk / S.-W. Wu, J.-L. Ko, B.-H. Liu [et al.] // *Toxins*. – 2020. – Vol. 12, № 10. <https://doi.org/10.3390/toxins12100637>

138. A signal-on photoelectrochemical aptasensor for chloramphenicol assay based on 3D self-supporting AgI/Ag/BiOI Z-scheme heterojunction arrays / J.-H. Zhu, Y.-G. Feng, A.-J. Wang [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2021. – Vol. 181. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113158>

139. A study of the origin of chloramphenicol isomers in honey / D. Yanovych, B. Berendsen, Z. Zasadna [et al.] // *Drug Testing and Analysis*. – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 416–422. <https://doi.org/10.1002/dta.2234>

140. A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance / M. J. Mitcheltree, A. Pisipati, E. A. Syroegin [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 599. – P. 507–512. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04045-6>

141. Acquired antibiotic resistance genes: an overview / A. H. A. M. van Hoek, D. Mevius, B. Guerra [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2011. – Vol. 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>

142. Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food / L. R. Guidia, P. A. S. Tette, C. Fernandes [et al.] // *Talanta*. – 2017. – Vol. 162. – P. 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.068>

143. Amiripour, F. 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 / F. Amiripour, S. Ghasemi, S. N. Azizi // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 347. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129034>

144. An aptamer-based effective method for highly sensitive detection of chloramphenicol residues in animal-sourced food using real-time fluorescent quantitative PCR / Y. Duan, L. Wang, Z. Gao [et al.] // *Talanta*. – 2017. – Vol. 165. – P. 671–676. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.12.090>

145. Analysis of antibiotic residues in raw bovine milk and their impact toward food safety and on milk starter cultures in cheese-making process / L. M. Chiesa, L. DeCastelli, M. Nobile [et al.] // *LWT*. – 2020. – Vol. 131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109783>

146. Antibiotic residues and antibiotic –resistant bacteria detected in milk marketed for human consumption in Kibera, Nairobi / K. Brown, M. Mugoh, D. R. Call [et al.] // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15, № 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233413>

147. Antibiotic residues in milk and cheeses after the off-label use of macrolides in dairy goats / P. Quintanilla, M. C. Beltrán, B. Peris [et al.] // *Small Ruminant Research*. – 2018. – Vol. 167. – P. 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.08.008>

148. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future / S. Sach, J. Ferdous, M. H. Sikder [et al.] // *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. – 2019. – Vol. 6, № 3. – P. 315–332. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f350>

149. Antibiotic resistance and epigenetics: More to it than meets the eye / D. Ghosh, B. Veeraraghavan, R. Elangovan [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2020. – Vol. 64, № 2. <https://doi.org/10.1128/AAC.02225-19>

150. Antibiotic resistance and persistence – Implications for human health and

treatment perspectives / M. Huemer, S. M. Shambat, S. D Brugger [et al.] // EMBO Reports. – 2020. – Vol. 21, № 12. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>

151. Antibiotic resistance genetic markers and integrons in white soft cheese: Aspects of clinical resistome and potentiality of horizontal gene transfer / A. C. L. de Paula, J. D. Medeiros, A. C. De Azevedo [et al.] // Genes. – 2018. – Vol. 19, № 2. <https://doi.org/10.3390/genes9020106>

152. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications / C. Manyi-Loh, S. Mamphweli, E. Meyer [et al.] // Molecules. – 2018. – Vol. 23, № 4. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

153. Antibiotic use in livestock and residues in food – A public health threat: A review / O. M. Ghimpețeanu, E. N. Pogurschi, D. C. Popa [et al.] // Foods. – 2022. – Vol. 11, № 10. <https://doi.org/10.3390/foods11101430>

154. Antibiotics in dairy production: Where is the problem? / M. Virto, G. Santamarina-García, G. Amores [et al.] // Dairy. – 2022. – Vol. 3, № 3. – P. 541–564. <https://doi.org/10.3390/dairy3030039>

155. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance / G. S. Bbosa, N. Mwebaza, J. Odda [et al.] // Health. – 2014. – Vol. 6, № 5. – P. 410–425. <https://doi.org/10.4236/health.2014.65059>

156. Antimicrobial activity in cheese whey as an indicator of antibiotic drug transfer from goat mil / J. Giraldo, R. L. Althaus, M. C. Beltrán [et al.] // International Dairy Journal. – 2017. – Vol. 69. – P. 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.02.003>

157. Antimicrobial consumption in medicated feeds in Vietnamese pig and poultry production / V. C. Nguyen, N. T. Nhung, N. H. Nghia [et al.] // EcoHealth. – 2016. – Vol. 13. – P. 490–498. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1130-z>

158. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. isolated from sheep and goat cheeses / J. Výrostková, I. Regecová, E. Dudriková [et al.] // Foods. – 2021. – Vol. 10, № 8. <https://doi.org/10.3390/foods10081844>

159. Antimicrobial resistance: Its surveillance, impact, and alternative

management strategies in dairy animals / C. Sharma, N. Rokana, M. Chandra [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2018. – Vol. 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00237>

160. Antimicrobial susceptibility/resistance of *Streptococcus pneumoniae* / E. Karcic, M. Aljicevic, S. Bektas [et al.] // *Materia Socio-Medica*. – 2015. – Vol. 27, № 3. – P. 180–184. <https://doi.org/10.5455/msm.2015.27.180-184>

161. Antimicrobial use, residues, resistance and governance in the food and agriculture sectors, Tanzania / R. H. Mdegela, E. R. Mwakapeje, B. Rubegwa [et al.] // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10, № 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040454>

162. Aptamer-mediated colorimetric method for rapid and sensitive detection of chloramphenicol in food / C. Yan, J. Zhang, L. Yao [et al.] // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 260. – P. 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.014>

163. Aptasensors as the future of antibiotics test kits – a case study of the aptamer application in the chloramphenicol detection / Z. Khoshbin, A. Verdian, M. R. Housaindokht [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 122. – P. 263–283. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.060>

164. Autofluorescence-based investigation of spatial distribution of phenolic compounds in soybeans using confocal laser microscopy and a high-resolution mass spectrometric approach / M. P. Razgonova, Yu. N. Zinchenko, D. K. Kozak [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, № 23. <https://doi.org/10.3390/molecules27238228>

165. Bacanlı, M. Importance of antibiotic residues in animal food / M. Bacanlı, N. Başaran // *Food and Chemical Toxicology*. – 2019. – Vol. 125. – P. 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>

166. Ballesteros, E. Simultaneous determination of 20 pharmacologically active substances in cow's milk, goat's milk, and human breast milk by gas chromatography-mass spectrometry / E. Ballesteros, A. Azzouz, B. Jurado-Sánchez [et al.] *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59. P. 5125–32. <https://doi.org/10.1021/jf200364w>.

167. Britzi, M. 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 spectroscopy / M. Britzi, F. Schwartsburd // *International Journal of Analytical and Bioanalytical Methods*. – 2019. – Vol. 1, № 1. <https://doi.org/10.35840/2633-8912/2405>

168. Brook, I. Antimicrobials therapy of anaerobic infections / I. Brook // *Journal of Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 28, № 3. – P. 143–150. <https://doi.org/10.1179/1973947815Y.0000000068>

169. Characteristics of ripened Tronchon cheese from raw goat milk containing legally / P. Quintanilla, M. C. Beltrán, A. Molina [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2019. – Vol. 102, № 4. – P. 2941–2953. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15532>

170. Characterization of bacteria and antibiotic resistance in commercially produced cheeses sold in China / J. Yao, J. Gao, J. Guo [et al.] // *Journal of Food Protection*. – 2022. – Vol. 85, № 3. – P. 484–493. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-198>

171. Chernykh, I. Customary norms in international space law: Currents status and future perspectives / I. Chernykh // *5th International Multidisciplinary Scientific Conference on social sciences and arts SGEM 2018: Conference proceedings*. – Sofia : STEF92 Technology Ltd., 2018. – P. 499–506. <https://doi.org/10.5593/sgemsocial2018/1.2/S02.066>

172. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete / J. Ehrlich, Q. R. Bartz, R. M. Smith [et al.] // *Science*. – 1947. – Vol. 106. <https://doi.org/10.1126/science.106.2757.417>

173. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete / W. Erlich, Q. R. Bartz, R. M. Smith [et al.] // *Science*. – 1947. – Vol. 106, № 2757. – P. 417–419. <https://doi.org/10.1126/science.106.2757.417>

174. Conformation and quantification of chloramphenicol in cow's urine, muscle and eggs by electron capture negative ion chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry // E. van der Heeft, A. P. de Jong, L. A. van Ginkel [et al.] // *Biol Mass Spectrom*. – 2019. – Vol. 20. P. 763–770.

175. Cochrane, S. A. Breaking down the cell wall: Strategies for antibiotic discovery targeting bacterial transpeptidases / S. A. Cochrane, C. T. Lohans // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 194.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112262>

176. Consumer perceptions of antimicrobial use in animal husbandry: A scoping review / J. R. Barrett, G. K. Innes, K. A. Johnson [et al.] // PLoS ONE. – 2021. – Vol. 16, № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261010>

177. Control of animal products contamination with nitroimidazole group antibiotics / A. Prosekov, T. Podlegaeva, O. Chaplygina [et al.] // E3S Web of Conferences. – 2020. – Vol. 222, № 1. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022206019>

178. Cook, M. A. The past, present, and future of antibiotics / M. A. Cook, G. D. Wright // Science Translational Medicine. – 2022. – Vol. 14, № 657. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>

179. da Cunha, B. R. Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? / B. R. da Cunha, L. P. Fonseca, C. R. C. Calado // Antibiotics. – 2019. – Vol. 8, № 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>

180. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem / S. A. de Albuquerque Fernandes, A. P. A. Magnavita, S. P. B. Ferrao [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – Vol. 21. – P. 3427–3434. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2286-5>

181. Dajani, A. S. The renaissance of chloramphenicol / A. S. Dajani, R. E. Kauffman // Pediatric Clinics of North America. – 1981. – Vol. 28, № 1. – P. 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)33970-0](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)33970-0)

182. Detection of antibiotics residues in dairy products sold in Ouagadougou, Burkina Faso / T. S. Bagre, S. Samandoulougou, M. Traore [et al.] // Journal of Applied Biosciences. – 2015. – Vol. 87. – P. 8105–8112. <https://doi.org/10.4314/jab.v87i1.11>

183. Determination of amphenicol antibiotics and their glucuronide metabolites in urine samples using liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry / M. Pastor-Belda, N. Campillo, N. Arroyo-Manzanares [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2020. – Vol. 1146. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122122>

184. 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 / B. Vuran, H. I. Ulusoy, G. Sarp [et al.] // Talanta.

– 2021. – Vol. 230. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122307>

185. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry / J. Shen, X. Xia, H. Jiang [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2009. – Vol. 877. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.040>.

186. Distribution of animal drugs between skim milk and milk fat fractions in spiked whole milk: Understanding the potential impact on commercial milk products / H. Hakk, N. W. Shappell, S. J. Lupton [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 64, № 1. – P. 326–335. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04726>

187. Distribution of spiked drugs between milk fat, skim milk, whey, curd, and milk protein fractions: Expansion of partitioning models / S. J. Lupton, N. W. Shappell, W. L. Shelver [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 66, № 1. – P. 306–314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04463>.

188. Doğan, Y. N. Chloramphenicol and sulfonamide residues in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fish from aquaculture farm / Y. N. Doğan, Ş. Pamuk, Z. Gürler // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – Vol. 27. – P. 41248–41252. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09942-3>.

189. Dörr, T. Understanding tolerance to cell wall-active antibiotics / T. Dörr // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 1496, № 1. – P. 35–58. <https://doi.org/10.1111/nyas.14541>.

190. Determination of chloramphenicol in meat samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry // S. Akter Mou, R. Islam, M. Shoeb Stastkova [et al.] // *Food Science & Nutrition*. – 2021. – Vol. 9. – № 10. – P. 5670–5675. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2530>.

191. Effect of chloramphenicol antibiotics on the activity of yoghurt cultures / P. Navrátilová, I. Borkovcova, Z. Stastkova [et al.] // *Foods*. – 2022. – Vol. 11, № 18. <https://doi.org/10.3390/foods11182751>.

192. Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production / M. Pazzola, G. Stocco, M. L. Dettori [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2019. – Vol. 102, № 5. – P. 3947–3955. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15397>.

193. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus* / D. Eluk, R. Ceruti, O. Nagel [et al.] // Journal of Dairy Research. – 2019. – Vol. 86, № 1. – P. 102–107. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000098>.

194. Effects of antibiotics on gut microbiota / K. Lange, M. Buerger, A. Stallmach [et al.] // Digestive Diseases. – 2016. – Vol. 34, № 3. – P. 260–268. <https://doi.org/10.1159/000443360>.

195. Efficacy and safety of chloramphenicol: Joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / N. Eliakim-Raz, A. Lador, Y. Leibovici-Weissman [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2015. – Vol. 70, № 4. – P. 979–996. <https://doi.org/10.1093/jac/dku530>.

196. El-Sayed, A. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era / A. El-Sayed, M. Kamel // Tropical Animal Health and Production. – 2021. – Vol. 53. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9>.

197. El-Zubeir, I. E. M. Antimicrobial resistance of bacteria associated with raw milk contaminated by chemical preservatives / I. E. M. El-Zubeir, O. El Owni // World Journal of Dairy and Food Sciences. – 2009. – Vol. 4, № 1. – P. 65–69.

198. Enrofloxacin treatment on dairy goats: Presence of antibiotic in milk and impact of residue on technological process and characteristics of mature cheese / P. Quintanilla, M. C. Beltrán, M. P. Molina [et al.] // Food Control. – 2020. – Vol. 123. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107762>.

199. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health / Samreen, I. Ahmad, H. A. Malak [et al.] // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2021. – Vol. 27. – P. 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>

200. Evaluation of the Charm maximum residue limit β -lactam and tetracycline test for the detection of antibiotics in ewe and goat milk / M. C. Beltrán, T. Romero, R. L. Althaus [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2013. – Vol. 96, № 5. – P. 2737–2745. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6044>.

201. Food safety margin assessment of antibiotics: Pasteurized goat's milk and fresh cheese / P. Quintanilla, E. Doménech, I. Escriche [et al.] // Journal of Food

Protection. – 2019. – Vol. 82, № 9. – P. 1553–1559. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-434>.

202. Gaudin, V. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review / V. Gaudin // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2017. – Vol. 90. – P. 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>.

203. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 / E. Y. Klein, T. P. van Boeckel, E. M. Martinez [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115, № 15. – P. E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>

204. Gould, K. Antibiotics: from prehistory to the present day / K. Gould // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 71, № 3. – P. 572–575. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>.

205. Hammad, A. M. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese / A. M. Hammad, H. A. Hassan, T. Shimamoto // *Food Control*. – 2022. – Vol. 50. – P. 815–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.020>.

206. Hanekamp, J. C. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol / J. C. Hanekamp, A. Bast // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2015. – Vol. 39, № 1. – P. 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.016>

207. Health concerns and management of select veterinary drug residues / R. E. Baynes, K. Dedonder, L. Kissell [et al.] // *Food and Chemical Toxicology*. – 2016. – Vol. 88. – P. 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>.

208. High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS) / L. Jank, M. T. Martins, Ju. B. Arsand [et al.] // *Talanta*. – 2015. – Vol. 144. – P. 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.078>.

209. High-throughput planar solid-phase extraction coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry via the auto TLC-MS interface for screening of 66 multi-

class antibiotic residues in food of animal origin / A. Mehl, L. J. Schmidt, L. Schmidt [et al.] // Food Chemistry. – 2021. – Vol. 351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129211>.

210. Hutchings, M. I. Antibiotics: past, present and future / M. I. Hutchings, A. W. Truman, B. Wilkinson // Current Opinion in Microbiology. – 2019. – Vol. 51. – P. 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.

211. Hobertson, J. H. Gas-liquid chromatography of antibiotics / J. H. Hobertson, K. Tsuji // Methods Enzymol. – 1975. Vol. 43. P. 213–256.

212. Hydrophilic interaction liquid chromatography of aminoglycoside antibiotics with a diol-type stationary phase / F. Ianni, L. Pucciarini, A. Carotti [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 2018. – Vol. 1044. – P. 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.008>.

213. Identification of antibiotic residues in raw milk samples coming from the metropolitan area of Bucharest / E. Pogurschi, A. Ciric, C. Zugrav [et al.] // Agriculture and Agricultural Science Procedia. – 2015. – Vol. 6. – P. 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.066>.

214. Impact of a thermisation treatment on oxytetracycline spiked ovine milk: Fate of the molecule and technological implications / R. Cabizza, N. Rubattu, S. Salis [et al.] // LWT. – 2018. – Vol. 96. – P. 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.026>.

215. In vitro study about the effect of several penicillins during the fermentation of yogurt made from ewe's milk / M. I. Berruga, M. P. Molina, B. Novés [et al.] // Milchwissenschaft. – 2007. – Vol. 62, № 3. – P. 303–305.

216. Inappropriate use of topical chloramphenicol results in vision loss / N. McDerby, S. L. Watson, D. Robaei [et al.] // Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2014. – Vol. 43, № 2. – P. 192–193. <https://doi.org/10.1111/ceo.12465>.

217. Influence of enrofloxacin on the coagulation time and the quality parameters of goat's milk yoghurt / M. C. Beltrán, A. Morari-Pirlog, P. Quintanilla [et al.] // International Journal of Dairy Technology. – 2018. – Vol. 71, № 1. – P. 105–111. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12388>.

218. Investigation of the effects of some processing conditions on the fate of

oxytetracycline and tylosin antibiotics in the making of commonly consumed cheeses from the East Mediterranean / H. F. Hassan, L. Saidy, R. Haddad [et al.] // *Veterinary World*. – 2021. – Vol. 14, № 6. – P. 1644–1649. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1644-1649>.

219. Jukes, T. H. *Antibiotics in Nutrition* / T. H. Jukes. – New York : Medical Encyclopedia, Inc., 1955. – 128 p.

220. Karlowski, K. Determination of chloramphenicol residues in milk by the gas chromatography method / K Karlowski // *Rocz Panstw Zakl Hig.* – 2016. – Vol. 27. P. 629–633.

221. Khardori, N. Antibiotics: From the beginning to the future: Part 2 / N. Khardori, C. Stevaux, K. Ripley // *The Indian Journal of Pediatrics*. – 2020. – Vol. 87, № 1. – P. 43–47. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-03113-0>.

222. László, N. Food safety significance of the inhibitors in milk / N. László, J. Lehel, P. Laczay // *Magyar Allatorvosok Lapja*. – 2016. – Vol. 138, № 8. – P. 483–493.

223. László, N. LC-MS study of the heat degradation of veterinary antibiotics in raw milk after boiling / N. László, K. Lányi, P. Laczay // *Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 267. – P. 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.041>.

224. Mackenzie, L. E. Antibiotics in agriculture: the retail customer perspective / L. E. Mackenzie // *Australian Veterinary Journal*. – 2019. – Vol. 97, № 8. – P. 292–294. <https://doi.org/10.1111/avj.12822>.

225. Mathur, S. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review / S. Mathur, R. Singh // *International Journal of Food Microbiology*. – 2005. – Vol. 105, № 3. – P. 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>.

226. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 7: *Amphenicols: florfenicol and thiamphenicol* / K. Koutsoumanis, A. Allende, A. Alvarez-Ordóñez [et al.] // *EFSA Journal*. – 2021. – Vol. 19. – № 10. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6859>.

227. McEwen, S. A. Antimicrobial resistance: a one health perspective / S. A. McEwen, P. J. Collignon // *Microbiology Spectrum*. – 2018. – Vol. 6, № 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>.

228. Mehlhorn, A. Aptamer-based biosensors for antibiotic detection: A review / A. Mehlhorn, P. Rahimi, Y. Joseph // *Biosensors*. – 2018. – Vol. 8. <https://doi.org/10.20944/preprints201804.0343.v2>.

229. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production / B. Tilocca, N. Costanzo, V. M. Morittu [et al.] // *Journal of Proteomics*. – 2020. – Vol. 210. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>.

230. Mohr, K. I. History of antibiotics research / K. I. Mohr // *How to overcome the antibiotic crisis. Facts, challenges, technologies and future perspectives* / eds. M. Stadler, P. Dersch. – Cham : Springer, 2016. – P. 237–272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499.

231. Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review / R. Rossi, G. Saluti, S. Moretti [et al.] // *Food Additives and Contaminants: Part A*. – 2018. – Vol. 35, № 2. – P. 241–257. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1393107>.

232. Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: An overview / R. Vivas, A. A. T. Barbosa, S. S. Dolabela [et al.] // *Microbial Drug Resistance*. – 2019. – Vol. 25, № 6. – P. 890–908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>

233. Novel use of oral chloramphenicol for treatment-resistant *Mycoplasma genitalium* / J. J. Goodfellow, S. Hughes, J. Smith [et al.] // *Sexually Transmitted Infections*. – 2023. – Vol. 99, № 3. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2022-055621>.

234. Novozhytska, Yu. Validation of methods of determination residual veterinary of drugs in products of animal origin / Yu. Novozhytska, O. Ivanova, J. Dobrogan // *Scientific Journal of Veterinary Medicine*. – 2015. – № 2. – P. 14–18.

235. Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil / G. N. Zanella, J. M. G. Mikcha, E. Bando [et al.] // *Journal of Food Protection*. – 2020. – Vol. 73, № 9. – P. 1684–1687. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1684>.

236. On the role of controlling systems in the quality of food products / S. E. Shukesheva, Y. A. M. Uzakov, Z. S. Nabiyeva [et al.] // *Journal of Advanced Research in Dynamical and Control Systems*. – 2018. – Vol. 10, № 13. – P. 642–648.

237. Optical and electrochemical aptasensors for the detection of amphenicols / A. S. Sadeghi, N. Ansari, M. Ramezani [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2018. – Vol. 118. – P. 137–152. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.045>.

238. Optical biosensors – Illuminating the path to personalized drug dosing / J. J. Ong, T. D. Pollard, A. Goyanes [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2021. – Vol. 188. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113331>.

239. Patyra, E. Quantification and analysis of trace levels of phenicols in feed by liquid chromatography-mass spectrometry / E. Patyra, K. Kwiatek // *Chromatographia*. – 2020. – Vol. 83. – P. 715–723. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03890-3>.

240. Piñeiro, S. A. Antimicrobial drug residues in animal-derived foods: Potential impact on the human intestinal microbiome / S. A. Piñeiro, C. E. Cerniglia // *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. – 2020. – Vol. 44, № 2. – P. 215–222. <https://doi.org/10.1111/jvp.12892>.

241. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis / J. Zhang, J. Wang, J. Jin [et al.] // *Food Research International*. – 2022. – Vol. 162. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111969>.

242. Quality of community pharmacy practice in antibiotic self-medication encounters: A simulated patient study in upper Egypt / A. I. Abdelaziz, A. G. Tawfik, K. A. Rabie [et al.] // *Antibiotics*. – 2019. – Vol. 8, № 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020035>.

243. QuEChERS and HPLC-MS/MS combination for the determination of chloramphenicol in twenty two different matrices / T. Śniegocki, B. Sell, M. Giergiel [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 3. <https://doi.org/10.3390/molecules24030384>

244. Rapid quantitative detection of chloramphenicol in milk by microfluidic immunoassay / M. Zhao, X. Li, Y. Zhang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – Vol. 339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127857>.

245. Relationship between the dynamics of gross composition, free fatty acids and biogenic amines, and microbial shifts during the ripening of raw ewe milk-derived Idiazabal cheese / G. Santamarina-García, G. Amores, E. L. de Armentia [et al.] //

Animals. – 2022. – Vol. 12, № 22. <https://doi.org/10.3390/ani12223224>.

246. 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 / M. Rezaee, E. Khalilian // *Food Analytical Methods*. – 2018. – Vol. 11. – P. 759–767. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1048-2>.

247. Rizwan, M. Trends and advances in electrochemiluminescence nanobiosensors / M. Rizwan, N. F. Mohd-Naim, M. U. Ahmed // *Sensors*. – 2018. – Vol. 18, № 1. <https://doi.org/10.3390/s18010166>.

248. Sa-nguanprang, S. 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 / S. Sa-nguanprang, A. Phuruangrat, O. Bunkoeda // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2022. – Vol. 264. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120324>.

249. Septimus, E. J. Antimicrobial resistance: An antimicrobial/diagnostic stewardship and infection prevention approach / E. J. Septimus // *Medical Clinics of North America*. – 2018. – Vol. 102, № 5. – P. 819–829. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.04.005>.

250. Sharma, S. Antibiotic resistance in ocular bacterial pathogens / S. Sharma // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 218–222. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.83903>.

251. 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 / B. Liu, J. Xie, Z. Zhao [et al.] // *Chinese Journal of Chromatography*. – 2021. – Vol. 39, № 4. – P. 406–414.

252. Simultaneous determination of erythromycin, tetracycline, and chloramphenicol residue in raw milk by molecularly imprinted polymer mixed with solid-phase extraction / Y. Xie, Q. Hu, M. Zhao [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2018. – Vol. 11. – P. 374–381. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1008-x>.

253. Stokstad, E. L. R. Antibiotics in animal nutrition / E. L. R. Stokstad //

Physiological Reviews. – 1954. – Vol. 34, № 1. – P. 25–51.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1954.34.1.25>.

254. Structure-switching fluorescence aptasensor for sensitive detection of chloramphenicol / P. Ma, Y. Sun, I. M. Khan [et al.] // *Microchimica Acta*. – 2020. – Vol. 187. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04471-9>.

255. Survey on antimicrobial usage in local dairy cows in North-central Nigeria: Drivers for misuse and public health threats / N. B. Alhaji, M. B. Aliyu, I. Ghali-Mohammed [et al.] // *PLoS ONE*. – 2019. – Vol. 14, № 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224949>.

256. Tasho R. P., Cho J. Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review / R. P. Tasho, J. Y. Cho // *Science of the Total Environment*. – 2016. – Vol. 563–564. – P. 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.140>.

257. ter Kuile, B. H. The risk of low concentrations of antibiotics in agriculture for resistance in human health care / B. H. ter Kuile, N. Kraupner, S. Brul // *FEMS Microbiology Letters*. – 2016. – Vol. 363, № 19. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw210>.

258. Tetracycline antibiotics transfer from contaminated milk to dairy products and the effect of the skimming step and pasteurisation process on residue concentrations / A. Gajda, E. Nowacka-Kozak, M. Gbylik-Sikorska [et al.] // *Food Additives and Contaminants: Part A*. – 2018. – Vol. 35, № 1. – P. 66–76. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1397773>.

259. The “force” of cloxacillin residue will be with you in various dairy products – The last experimental evidence / M. Gbylik-Sikorska, A. Gajda, E. Nowacka-Kozak [et al.] // *Food Control*. – 2021. – Vol. 121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107628>

260. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014 // *EFSA Journal*. – 2016. – Vol. 14, № 2. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4380>.

261. The food production environment and the development of antimicrobial resistance in human pathogens of animal origin / M. Lekshmi, P. Ammini, S. Kumar [et al.] // *Microorganisms*. – 2017. – Vol. 5, № 1.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms5010011>.

262. Total determination of chloramphenicol residues in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / H. Kikuchi, T. Sakai, R. Teshima [et al.] // *Food Chemistry*. – 2019. – Vol. 230. – P. 589–593. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.071>.

263. Tfenning, A. P. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine, and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection / A. P. Tfenning, J. Roybal, J. Hurlbut // *Journal of AOAC International*. – 2020. – Vol. 83. – P. 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.071>.

264. Transfer of antibiotics from goat's milk to rennet curd and whey fractions during cheese-making / J. Giraldo, C. Igualada, R. Cabizza [et al.] // *Food Chemistry*. – 2022. – Vol. 392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133218>.

265. Transfer of certain beta-lactam antibiotics from cow's milk to fresh cheese and whey / K. Lányi, L. Darnay, N. László [et al.] // *Food Additives and Contaminants: Part A*. – 2022. – Vol. 39, № 1. – P. 52–60. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1973114>.

266. Transfer of oxytetracycline from ovine spiked milk to whey and cheese / R. Cabizza, N. Rubattu, S. Salis [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2017. – Vol. 70. – P. 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.002>.

267. Treiber, F. M. Antimicrobial residues in food from animal origin – A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide / F. M. Treiber, H. Beranek-Knauer // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10, № 5. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050534>.

268. Unveiling the impact of antibiotics and alternative methods for animal husbandry: A review / C. X. Low, L. T.-H. Tan, N.-S. Ab Mutalib [et al.] // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 10, № 5. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050578>.

269. Usege of milk production waste for obtaining functional food products for baby and dietetic nutrition / L. A. Ostroumov, A. Yu. Prosekov, O. O. Babich [et al.] // *European Journal of Natural History*. – 2013. – № 2. – P. 41–45.

270. Validation of a multi-residue UHPLC-HRMS method for antibiotics screening in milk, fresh cheese, and whey / C. Igualada, J. Giraldo, G. Font [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2022. – Vol. 106. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104265>.

271. Validation of receptor-binding assays to detect antibiotics in goat's milk / M. C. Beltrán, M. Borràs, O. Nagel [et al.] // *Journal of Food Protection*. – 2014. – Vol. 77, № 2. – P. 308–313. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-253>.

272. Volatilome in milk for Grana Padano and Parmigiano-Reggiano cheeses: A first survey / M. Faustini, G. Q. Pastorino, C. Colombani [et al.] // *Veterinary Sciences*. – 2019. – Vol. 6. – № 2. <https://doi.org/10.3390/vetsci6020041>.

273. Voltammetric sensor for chloramphenicol determination based on a dual signal enhancement strategy with ordered mesoporous carbonapolydopamine and β -cyclodextrin / Y. Sun, T. Wei, M. Jiang [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2018. – Vol. 255. – P. 2155–2162. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.016>.

274. What is Antibiotic Resistance? And Why Is It Such a Problem? – URL: <https://www.eatmy.news/2022/12/what-is-antibiotic-resistance-and-why.html> (date of the application: 15.03.2022).

275. Zhang, Z. New insights into a classic aptamer: binding sites, cooperativity and more sensitive adenosine detection / Z. Zhang, O. Oni, J. Liu // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, № 13. – P. 7593–7601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx517>.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по НИР, д.э.н.

Е.А. Жидкова

«26» декабря 2022 г.

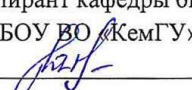
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ АМФЕНИКОЛОВ В
МОЛОКЕ И МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ С ПОМОЩЬЮ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ
С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ

Методические указания
МУК 05.01-03-05/2022

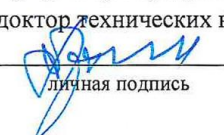
Дата введения в действие – «26» 12 2022 г.

РАЗРАБОТАНО:

Аспирант кафедры бионанотехнологии
ФГБОУ ВО «КемГУ»


личная подпись О.С. Чаплыгина

Профессор кафедры бионанотехнологии,
доктор технических наук ФГБОУ ВО «КемГУ»


личная подпись А. Ю. Просеков

Кемерово 2022



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)



115093, Г. МОСКВА, УЛ. ЛОСИНОВСКАЯ, Д. 35, КОРП.7, +7 (499) 236-31-64, INFO@VNIMI.ORG, WWW.VNIMI.ORG
 ОГРН 1037739374672 / ОКПО 00419785 / ИНН 7705009252 / КПП 770501001



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГАНУ «ВНИМИ»

А.Г. Галстян

«21» января 2023 г.

АКТ

апробации оптимизированного метода контроля антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором

Проведена верификация (подтверждение реализуемости) методики определения (МИ) остаточного содержания антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

Характеристика (показатель): остаточное содержание антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции.

Установлено:

1. Наличие актуальной редакции МИ – обеспечено.
2. Соответствие требований МИ к применяемому оборудованию (средствам измерений, испытательному оборудованию, вспомогательному оборудованию), реактивам и стандартным образцам, условиям выполнения измерений, порядку подготовки к выполнению измерений (отбор проб, приготовление реактивов и калибровочных проб, подготовка и калибровка оборудования), выполнению измерений, обработке и оформлению результатов измерений – обеспечено.
3. Соответствие требований МИ к показателям точности измерений и процедуре контроля точности результатов измерений – обеспечено.
4. Соответствие требований МИ к квалификации сотрудников, выполняющих измерения, – обеспечено.
5. Соответствие требований МИ к обеспечению безопасности выполняемых работ и экологической безопасности – обеспечено.

Продолжение приложения Б

| Условие (процедура) | Требование метода (методики) измерения | Оценка пригодности |
|--|---|---|
| 1. Идентификация метода | Методика определения (МИ) остаточного содержания антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором | Соответствует |
| 2. Область применения | Молоко и молочная продукция | Соответствует |
| 3. Методы определения | Остаточное содержание антибиотиков группы амфениколов | Метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором |
| 4. Диапазоны измерения | От мг/кг(дм ³) _____ до мг/кг(дм ³) | Соответствует |
| 5. Требования, обеспечивающие безопасность: 5.1. Требование к помещению лаборатории | Оборудованная приточно-вытяжная вентиляция в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.021 | Соответствует |
| 5.2. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны | В соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005 | Соответствует |
| 5.3. Требования техники безопасности при работе с химическими реактивами | В соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.007 | Соответствует |
| 5.4. Требования техники безопасности при работе с электроустановками | В соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.019 | Соответствует |
| 5.5. Требования пожарной безопасности | В соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, оснащение средствами пожаротушения – в соответствии с требованиями ГОСТ 12.4.009 | Соответствует |

Продолжение приложения Б

| Условие (процедура) | Требование метода (методики) измерения | Оценка пригодности |
|---|--|---|
| 6. Требования к оператору | Специалист, проводящий измерения должен иметь специальное образование и владеть методом | Соответствует |
| 7. Условия проведения измерений | Соблюдение следующих условий: - температура окружающего воздуха – от 15 °С до 30 °С; - относительная влажность воздуха – не более 80 %; - атмосферное давление – (96±10) кПа. | Соответствует |
| 8. Стандартные образцы | Антибиотики группы амфениколов | Аналитические стандарты хлорамфеникола, флорфеникола, флорфеникола амина с содержанием основного вещества >98% производства компаний Merck |
| 9. Приборы и оборудование | Хроматограф жидкостной с масс-спектрометрическим детектором | Хроматограф высокоэффективный жидкостной Infinity 1260 Ultivo Triple Quad LC/MS (мод. 6465), Сингапур, Agilent Technologies |
| 10. Процедуры: 10.1. Подготовка к проведению испытаний | Раздел МИ «Подготовка к проведению измерений» | Выполнено в полном объеме |
| 10.2. Проведение измерений | Раздел МИ «Проведение измерений» | Выполнено в полном объеме |
| 11. Обработка результатов измерений | Раздел МИ «Обработка результатов измерений» | Обработка первичных результатов испытаний проводится автоматически с применением программного обеспечения, прилагаемого к оборудованию. Обработка итоговых результатов измерений проводится согласно МИ |

Продолжение приложения Б

| Условие (процедура) | Требование метода (методики) измерения | Оценка пригодности |
|---------------------|--|--------------------|
| 12. Точность | Предел сходимости (повторяемости) не должен превышать значение, приведенное в МИ. Предела воспроизводимости не должен превышать значение, приведенное в МИ. | Соответствует |

Выводы:

1. Объекты аналитических работ и диапазоны измерения соответствуют области распространения МИ.
2. Применяемое оборудование (средства измерений) соответствует требованиям МИ.
3. Алгоритмы и периодичность контрольных процедур установлены.
4. Экспериментальный объем данных достаточен для подтверждения фактических значений погрешности, установленным в МИ.

Заключение:

1. Все работы по освоению и внедрению Методики определения (МИ) остаточного содержания антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором выполнены в полном объеме.
2. Показатели точности при реализации МИ в лаборатории для объекта «молоко и молочная продукция» не превышают показателей точности, приведенных в МИ. Поэтому за показатели точности в лаборатории для объекта «молоко и молочная продукция» приняты показатели точности МИ.
3. Методику определения (МИ) остаточного содержания антибиотиков группы амфениколов в молоке и молочной продукции с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором считать освоенной и внедренной в работу лаборатории.

Зав. лаб. теххимического
контроля и арбитражных методов
анализа ФГАНУ «ВНИМИ», к.т.н.



Е.А. Юрова

Продолжение приложения Б

ООО «ЮЖСКИЙ МОЛОЧНЫЙ ЗАВОД»

Россия, 155630 Ивановская обл., г. Южа, ул. Заводская, д. 5
 ИНН 3706020685. Р/с 40702810617000003515 в отделении №8639 ОАО «Сбербанка России» г. Иваново
 Тел./факс (49347) 2-36-25. E-mail: dubrava@dsn.ru

Утверждаю:

Директор

ООО «Южский молочный завод»

С.А. Закочурин

АКТ

производственных испытаний



28 февраля 2023 г.

Ивановская область,
г. Южа

Настоящим подтверждаем, что результаты диссертационного исследования Чаплыгиной О.С. на тему «Теоретическое обоснование и практическая реализация метода контроля амфениколов для биобезопасности молока и молочной продукции», а именно оптимизированный метод контроля антибиотиков группы амфениколов прошел экспериментальную апробацию в производственной лаборатории ООО «Южский молочный завод». Полученные результаты подтверждают принципиальную возможность их практического использования в производственном процессе.

Начальник лаборатории

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Горева', written over a horizontal line.

Горева Н.В.

аналитических методов и толковании результатов (2002/657/ЕС) и считается внедрённым в работу лаборатории.

Данный метод обладает высокой чувствительностью, точностью, эффективностью и может быть использован для определения остаточных количеств антибиотиков группы амфениколов в продуктах животноводства (молоке и молочной продукции).

Председатель зав. лабораторией

д.т.н., доцент



С.А. Сухих

Члены комиссии

Старший научный сотрудник, к.т.н.



Ю.В. Куликова

Старший научный сотрудник, к.т.н.

С.Ю. Носкова