



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 104293

(13) U

(51) МПК

G01N 5/02 (2006.01)

G01N 7/02 (2006.01)

A61K 31/18 (2006.01)

A23L 1/08 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ****(21)** Номер заявки: **u 2015 06228****(22)** Дата подання заявки: **24.06.2015****(24)** Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.01.2016****(46)** Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.01.2016, Бюл.№ 2****(72)** Винахідник(и):

Коцюмбас Ігор Ярославович (UA),  
Янович Дмитро Вадимович (UA),  
Засадна Звенислава Станіславівна (UA),  
Мисько Галина Львівна (UA),  
Кіслова Світлана Максимівна (UA),  
Біронт Надія Володимирівна (UA),  
Мелікян Світлана Мікаелівна (UA),  
Паздерська Оксана Миколаївна (UA),  
Майба Наталя Андріївна (UA)

**(73)** Власник(и):

ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ  
КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ  
ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА  
КОРМОВИХ ДОБАВОК,  
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019 (UA)

**(54) СПОСІБ ПІДГОТОВКИ ПРОБ МЕДУ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАНІЛАМІДІВ****(57)** Реферат:

Спосіб підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів включає кислотний гідроліз комплексів сульфаніламідів з цукрами меду 2,0 н розчином хлоридної кислоти та наступним поетапним екстрагуванням етилацетатом звільнених у водне середовище залишків сульфаніламідів за зміни градієнту рН розчину від 1,1-1,4 до 7,5-8,0. Додавання етилацетату і, відповідно, екстрагування етилацетатом звільнених сульфаніламідів у пробірці з гідролізованими зразками меду починають відразу після закінчення гідролізу, коли значення рН екстракту становить 1,1-1,4.

UA 104293 U



Корисна модель належить до ветеринарної медицини, ветеринарно-санітарної експертизи, зокрема, до способів підготовки проб меду для визначення сульфаніламідів, і може бути використаний для контролю якості продуктів харчування (меду).

За обсягом виробництва меду Україна займає третє місце в світі (FAO, 2009-2011). Станом на кінець 2013 року цей показник становить приблизно 80 тис. тонн, з яких заведно 22 % експортується на світові ринки. За показниками експорту Україна займає тільки 22 місце. Найбільшою перешкодою, яка стоїть на заваді подальшому збільшенню експорту українського меду, є наявність у ньому залишків антимікробних препаратів. Найчастіше у меді виявляють залишки антибіотиків та антимікробних препаратів: хлорамфеніколу, нітрофуранів, нітроїмідазолів, сульфаніламідів, тетрациклінів та аміноглікозидів. В Україні не зареєстровано жодного препарату для лікування бджіл, який би містив вищезгадані діючі речовини, через заборону використання їх у бджільництві. Присутність залишків згаданих речовин у меді є наслідком несанкціонованого застосування бджолярами контрабандних препаратів або медичних препаратів доступних в роздрібних аптеках гуманної медицини.

У зв'язку з широкою розповсюдженістю антимікробних препаратів та сульфаніламідів у гуманній та ветеринарній медицині контроль їх залишків у продуктах тваринництва має велике значення. Для ветеринарних препаратів, які використовуються у тваринництві, Постановою ЄС 2377/90 встановлені МДР (максимально допустимі рівні) для зареєстрованих субстанцій ветеринарних препаратів, які пройшли реєстрацію EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - Європейська агенція з оцінки медичних препаратів). Зареєстровані препарати застосовують лише для тих видів тварин, які обумовлені при реєстрації і для яких встановлені МДР на залишки діючих субстанцій або їх метаболітів у тваринницькій продукції. Для бджіл, для яких не встановлені МДР антимікробних препаратів та сульфаніламідів, не можна застосовувати ці препарати. Для запобігання несанкціонованого використання цих препаратів у бджільництві важливе значення мають методи контролю продуктів бджільництва на присутність залишків антимікробних препаратів і сульфаніламідів. Згідно з існуючою практикою нижній рівень чутливості таких методик не повинен бути вищим за 10 мкг/кг [1, 2, 3, 4].

Розпорядженням № 95 від 07.07.06 Державного департаменту ветеринарної медицини України були встановлені вимоги до меж чутливості методик визначення сульфаніламідів у меді, які становлять 7 мкг/кг для усіх груп протимікробних препаратів і сульфаніламідів, за винятком сульфатіазолу, межа виявлення якого повинна бути не вищою за 3 мкг/кг.

Сучасна стратегія застосування аналітичних методів контролю вмісту залишків ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин базується на швидких скринінгових методах для відсіювання з великої кількості зразків лише тих, що не відповідають вимогам через перевищення максимально допустимих рівнів або мінімально допустиму межу виявлення. З цією метою широко застосовують різноманітні методи: мікробіологічний, тонкошарова хроматографія, імуноферментний аналіз, радіо-імуний метод, високоефективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим детектуванням, рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням. Усі ці методи мають свої переваги і недоліки.

Відомий швидкий мікробіологічний метод із застосуванням культури *Bacillus stearothermophilus calidolactis*, який застосовують для контролю продуктів тваринництва, зокрема молока, не зовсім адаптований для контролю меду.

Метод тонкошарової хроматографії ТШХ, що дозволяє виявляти залишкові кількості тетрациклінів та сульфаніламідів у м'ясі, є некоректним і недостатньо чутливим для аналізу меду.

Радіо-рецепторний метод (одна з модифікацій радіо-імуного методу аналізу, розроблена американською фірмою CHARM) відповідає вимогам чутливості при дослідженні меду. Однак, в окремих випадках можливе одержання, як неправдиво позитивних результатів, так і недооцінка вмісту присутніх залишків антимікробних препаратів.

Імуноферментний метод аналізу (ІФА) - є найбільш ефективним для виявлення залишків антимікробних препаратів у меді. Висока специфічність і селективність методу ELISA, одного з різновидів конкурентного гетерогенного ІФА, дозволяє проводити кількісну оцінку вмісту речовин, що визначаються, яка корелює із результатами одержаними із застосуванням таких методів підтвердження, як РХ/МС/МС та ВЕРХ/ФЛ.

Зважаючи на необхідність дотримання Україною взятих перед ЄС зобов'язань, щодо забезпечення показників безпеки експортного меду українського виробництва, необхідно розробити і забезпечити контролюючі установи України методикою групового визначення сульфаніламідів у меді з нижньою межею чутливості не вище 7 мкг/кг.

Визначення залишкових кількостей сульфаніламідів у зразках меду проводять методом високоефективної рідинної хроматографії з флюорометричним детектуванням (ВЕРХ/ФЛД). Важливе місце у дослідженні зразків меду на виявлення сульфаніламідів має спосіб підготовки зразків меду до проведення досліджень. За літературними даними відомо, що залишки сульфаніламідів в меді утворюють з його компонентами, зокрема цукрами, стійкі, погано розчинні комплекси, для руйнування яких проводять гідроліз у кислому середовищі [5, 6, 7].

Відомий Спосіб підготовки зразків меду, який використовують для підготовки зразків меду до проведення досліджень на виявлення залишкових кількостей сульфаніламідів, включає гідроліз зразків, нейтралізацію зразків і екстрагування етилацетатом. Зважені зразки меду розчиняють у 0,1 н хлоридній кислоті (HCl) і проводять гідроліз впродовж 1 год. за кімнатної температури (1 г меду розчиняють з 3 мл 0,1н HCl), далі проводять нейтралізацію, доводячи рН зразка під контролем рН-метра до 7,5-8,0, перемішують, ставлять на стабілізацію на 15 хв. і знову перевіряють рН. Екстрагування проводять додаванням 5 мл етилацетату, перемішують впродовж 10 хв., далі центрифугують 10 хв., відбирають 4,5 мл і висушують. Підготовлені зразки меду досліджують методом високоефективної рідинної хроматографії з флюорометричним детектуванням. Недоліком цього Способу є довгий період стабілізації системи на певному рівні рН розчину, що значно продовжує час проведення досліджень.

Нами пропонується Спосіб підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів для подальшого визначення сульфаніламідів імуноферментним методом (скринінг-метод) або методом високоефективної рідинної хроматографії із флюорометричним детектуванням (метод підтвердження), який полягає в оптимізації умов гідролізу та оптимізації процедури екстрагування етилацетатом. Оптимізація умов гідролізу передбачає розчинення зразка меду 2,0 н розчином хлоридної кислоти у співвідношенні 1:1 з наступним гідролізом при температурі 50 °С за дії ультразвуку протягом 30 хв.

Застосування Способу підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів для подальшого визначення аналіту методом ВЕРХ/ФЛД дозволить скоротити час підготовки зразків на 40 %. При цьому в 1,8-2,7 рази збільшується відсоток витяжки сульфаніламідів із зразків меду, що дозволяє збільшити чутливість Способу.

### 3.1. Суть корисної моделі і суттєві ознаки

В основу корисної моделі поставлена задача розробити Спосіб підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів для подальшого визначення сульфаніламідів імуноферментним методом або методом високоефективної рідинної хроматографії із флюорометричним детектуванням, який дозволяє значно скоротити час підготовки зразків для дослідження меду на виявлення залишків сульфаніламідів і збільшити чутливість методики.

За літературними даними відомо, що залишки сульфаніламідів в меді утворюють з його компонентами, зокрема із цукрами, стійкі погано розчинні комплекси, для руйнування яких проводять гідроліз у кислому середовищі [5, 6, 7].

Технічний результат, який полягає в скороченні часу (оптимізації) підготовки зразків проб меду і збільшенні чутливості методики для одночасного виявлення сульфаніламідів, досягають тим, що проводять кислотний гідроліз комплексів сульфаніламідів з цукрами меду 2,0 н розчином хлоридної кислоти та наступним поетапним екстрагуванням етилацетатом звільнених у водне середовище залишків сульфаніламідів за зміни градієнту рН розчину від 1,1-1,4 до 7,5-8,0. Додавання етилацетату і, відповідно, екстрагування етилацетатом звільнених сульфаніламідів у пробірці з гідролізованими зразками меду починається відразу після закінчення гідролізу, коли значення рН екстракту становить 1,1-1,4. При зміні значення рН до 7,5-8,0, розпочинається одночасне екстрагування інших сульфаніламідів (Табл. 1). Зміну градієнту рН середовища забезпечили додаванням до екстракційної суміші певної кількості солі гідрокарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$ . Поступове розчинення гідрокарбонату натрію, яке відбувається одночасно з екстрагуванням звільнених залишків сульфаніламідів, призводить до поступової зміни рН розчину зразка меду. Протягом часу екстрагування звільнені залишки сульфаніламідів екстрагуються етилацетатом, який є несприятливим середовищем для цукрів і забезпечує захист залишків сульфаніламідів від повторного утворення комплексів.

### 3.2. Відомості, що підтверджують суть корисної моделі

При проведенні патентно-інформаційного пошуку заявником знайдено технічне рішення - Спосіб підготовки зразків меду, у якому є спільні суттєві ознаки із заявленим рішенням (гідроліз зразків, екстрагування етилацетатом, нейтралізація). Однак, цих суттєвих ознак недостатньо для одержання очікуваного технічного результату, який полягає в скороченні часу (оптимізації) підготовки зразків проб меду і збільшенні чутливості методики для одночасного виявлення сульфаніламідів. Зважені зразки меду (по 1 г) розчиняють у 1 мл 2,0 н хлоридної кислоти (HCl), проводять гідроліз 30 хв. в ультразвуковій бані за температури 50 °С, далі проводять

екстрагування 9 мл етилацетату, шляхом ретельного перемішування впродовж 2 хв. Нейтралізацію проводять додаванням у екстракт 0,5 г гідрокарбонату натрію. Після цього зразки перемішують на вортексі 30 с (точкове перемішування), переставляють на шейк на 30 хв., центрифугують 10 хв., відбирають 8,1 мл і висушують.

Одним з найтриваліших етапів відомого Способу підготовки зразків меду є проведення кислотного гідролізу, необхідного для руйнування стійких комплексів, які утворюють залишки сульфаніламідів з цукрами меду. Для цього зразки меду розчиняють 0,1 н розчином хлоридної кислоти з наступним гідролізом впродовж 1 год. за кімнатної температури. Прискорення (оптимізація) гідролізу у новому Способі досягається розчиненням зразків меду 2,0 н розчином хлоридної кислоти у співвідношенні 1:1 з наступним гідролізом за температури 50 °C за дії ультразвуку протягом 30 хв.

Наступним етапом Способу підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів є екстрагування етилацетатом звільнених у водне середовище залишків сульфаніламідів, який полягає в поетапному екстрагуванні залишків сульфаніламідів етилацетатом за різного значення pH розчину. Додавання етилацетату в пробірки з гідролізованими зразками меду починається відразу після закінчення гідролізу, коли значення pH середовища становить 1,1-1,4, що забезпечує захист залишків сульфаніламідів від повторного утворення комплексів із цукрами. За таких умов залишки звільнених сульфаніламідів починають екстрагуватись етилацетатом. Оскільки оптимальне значення pH необхідне для одночасного екстрагування решти сульфаніламідів становить 7,5-8,0, то проводять градієнтну зміну значення pH від кислого до лужного додаванням певної кількості гідрокарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$ , що призводить до оптимізації умов екстрагування усіх сульфаніламідів. Повільне розчинення гідрокарбонату натрію, яке відбувається одночасно з екстрагуванням звільнених залишків сульфаніламідів призводить до поступової зміни значення pH зразка меду. Протягом часу екстрагування звільнені залишки сульфаніламідів екстрагуються етилацетатом, який є несприятливим середовищем для цукрів.

Застосування Способу, який заявляється, дозволяє скоротити час підготовки зразків для дослідження меду на присутність залишків сульфаніламідів на 40 %, збільшити відсоток витяжки аналітів із зразків меду в 1,8-2,7 разу, що дозволяє збільшити чутливість методу.

4. Відомості, що підтверджують можливість здійснення корисної моделі

4.1. Встановлення діапазона значення pH розчинів проб меду при їх екстрагуванні

Для вибору оптимальних умов одночасного екстрагування етилацетатом десяти сульфаніламідів (сульфагуанідин (SGD), сульфадіазин (SDZ), сульфатіазол (STZ), сульфамеразин (SMR), сульфаметазин (SMZ), сульфаметоксипіридазин (SMP), сульфаметоксазол (SMX), сульфадиметоксин (SDM), сульфаклорпіридазин (SCP), сульфаклорпіразин (SCD) нами встановлено діапазон pH у розчині проби від 3 до 8. Дані про залежність зміни відсотків витяжки сульфаніламідів від змін pH розчину наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Залежність витяжки сульфаніламідів від зміни значення pH розчинів при їх екстрагуванні (у % до значень, одержаних при pH - 8,0)

№	Сульфаніламід	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
1	сульфагуанідин (SGD)	58	70	98	115	95	100
2	сульфадіазин (SDZ)	157	160	190	195	145	100
3	сульфатіазол (STZ)	119	92	123	138	114	100
4	сульфамеразин (SMR)	87	79	101	107	96	100
5	сульфаметазин (SMZ)	N	64	91	102	89	100
6	сульфаметоксипіридазин (SMP)	83	99	122	130	112	100
7	сульфаметоксазол (SMX)	105	128	144	141	122	100
8	сульфадиметоксин (SDM)	129	170	194	164	118	100
9	сульфаклорпіридазин (SCP)	162	170	173	153	129	100
10	сульфаклорпіразин (SCD)	160	170	172	150	120	100

N - відсутність піку на хроматограмі.

Як видно з даних таблиці 1 значення pH оптимальне для екстрагування всіх десяти сульфаніламідів на приблизно однаковому рівні - 8,0. У подальшому було встановлено допустимі межі коливання цього оптимуму, які становлять 7,7-8,0. Додатковим фактором, який

вплинув на вибір нами значення pH 8,0 для екстрагування, було зменшення при цьому значенні pH, площі піку пара-амінобензойної кислоти (PABA) на хроматограмі зразків. У всіх інших варіантах дослідів за значень pH розчинів від 3,0 до 7,0 спостерігається висока інтенсивність піку PABA, який співпадає із піком сульфаметазину (SMZ), що робить неможливим визначення останнього і разом з тим створює небезпеку одержання неправдиво позитивних результатів.

4. 2. Визначення залишкових кількостей сульфаніламідів у пробах меду підготовлених Способом підготовки зразків меду та новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів.

Одночасне визначення залишкових кількостей 10 сульфаніламідів у пробах меду проводилося за критерієм "додано-одержано". З цією метою зразки меду було навантажено розчином суміші десяти сульфаніламідів для створення концентрації кожного з них на рівні 10 мкг/кг. На кресленні представлено хроматограму зразків меду навантаженого розчином суміші 10 сульфаніламідів в концентрації 10 нг/мл за підготовки проб меду відомим Способом та новим Способом, який заявляється.

Як видно з креслення площі піків, отримані за підготовки зразків меду навантаженого 10 сульфаніламидами за новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів (синій колір) значно вищі від площі піків, які отримані за підготовки зразків відомим Способом підготовки зразків у 1,3 разу (для сульфадиметоксин) до 3 раз (для сульфатуанідину).

Відсоток витяжки становить від щонайбільшого значення 65 % (STZ) до найменшого 34 % (SDM). Різницю у відсотках витяжки сульфаніламідів, одержану за застосування нового Способу підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів, можна пояснити неможливістю підібрати, в межах одного аналізу, ідеальних умов для екстрагування всіх десяти обраних сульфаніламідів. Це пояснює суттєву різницю (21 %) між відсотками витяжки (STZ) та (SDM). У літературних джерелах [6, 7] описані подібні співвідношення у різниці витяжки окремих сульфаніламідів за їх спільного екстрагування. Тому для нового Способу, який заявляється, запропоновано підготовку калібрувальних розчинів сульфаніламідів, який передбачає навантаження контрольних зразків меду стандартними калібрувальними розчинами з подальшим проведенням усіх процедур пробопідготовки, передбачених для зразків меду. При оцінці значень навантажених зразків меду за калібрувальною кривою, побудованою за цим принципом, у подальшому одержали значення відсотку витяжки, близьке до 90 %, без необхідності вводити корегуючі коефіцієнти.

4.3. Порівняння площі піків окремих сульфаніламідів на хроматограмах зразків меду, підготовлених відомим Способом підготовки проб та новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів.

Порівняння площі піків окремих сульфаніламідів на хроматограмах зразків меду, отриманих відомим Способом підготовки проб та новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів, наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняння площі піків окремих сульфаніламідів на хроматограмах зразків меду, отриманих відомим Способом підготовки проб та новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів

Сульфаніламиди	Площа піку (mAU:min)	
	Новий Спосіб	Відомий Спосіб
сульфагуанідин (SGD)	472,8	142,7
сульфадіазин (SDZ)	1559,3	440,4
сульфатіазол (STZ)	1103,8	456,3
сульфамеразин (SMR)	1204,1	617,2
сульфаметазин (SMZ)	844,1	607,9
сульфаметоксипіридазин (SMP)	696,4	436,4
сульфахлордиметоксин (SCD)	800,8	214,9
сульфаметоксазол (SMX),	1422,6	571,6
сульфадиметоксин (SDM)	503,1	280,9
сульфахлорпіразин (SCP)	860,8	196,1

За порівняння площі піків, наведених у таблиці 2, за дослідження зразків меду на виявлення у них залишків сульфаніламідів методом високоефективної рідинної хроматографії із

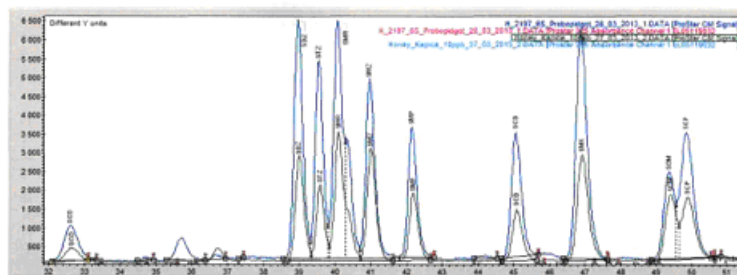
флюорометричним детектуванням за підготовки проб меду відомим Способом підготовки проб та новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів отримано такі результати: збільшення витяжки сульфаметазину, сульфаметоксипіридазину, сульфадиметоксину та сульфамеразину в 1,5-2 рази, сульфатіазолу та сульфаметоксазолу до 2,5 разів, сульфагуанідину, сульфадіазину та сульфахлордиметоксину в 3,3-3,8 разу, значне зростання площі піку сульфахлорпіразину в 4,4 разу. Отримані результати вказують на краще розділення та збільшення відсотку витяжки досліджуваних аналітів за підготовки проб меду новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів, про що свідчить зростання коефіцієнта розділення піків із 1,45 до 1,62.

Джерела інформації:

1. The EU legislation for honey residue control, R. Piro, F. Mutinelli, *Apiacta*, 38, 2003, P.15-20.
2. Antibiotic residues in honey, Sapna Johnson, Nimisha Jadon, Centre for science and environment 2010, p.48
3. F.Mutinelli European legislation governing the authorisation of veterinary medical products with particular reference to the use of drug for the control of honey bee diseases, *Apiacta* 38 (2003), p.156-168.
4. S.Bogdanov Current status of analytical methods for detection of residues in bee products, *Apiacta* 38 (2003), p. 190-197.
5. Liquid chromatography-fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. S.DeBaere, K.Baert, S.Croubels, J.DeBusser, K.DeWasch, P.DeBacker. *Anal Bioanal. Chem.* 2003; 376 (4) p. 534-541.
6. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. Kristof E. Maudens, Guo-Fang Zhang, Willy E. Lambert. *J Chrom A.* 2004, 1047; p.85-92.
7. Determination of sulfonamide residues in honey, J.M.Diserens, M.S.Savoy Perroud A.B. Henzelin, poster of NRC Nestle Research Center.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів, що включає кислотний гідроліз комплексів сульфаніламідів з цукрами меду 2,0 н розчином хлоридної кислоти та наступним поетапним екстрагуванням етилацетатом звільнених у водне середовище залишків сульфаніламідів за зміни градієнту рН розчину від 1,1-1,4 до 7,5-8,0, який **відрізняється** тим, що додавання етилацетату і, відповідно, екстрагування етилацетатом звільнених сульфаніламідів у пробірці з гідролізованими зразками меду починається відразу після закінчення гідролізу, коли значення рН екстракту становить 1,1-1,4.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зміна градієнту рН середовища забезпечується додаванням до екстракційної солі гідрокарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$ .



**Хроматограма зразків меду навантаженого розчином суміші 10 сульфаніламідів в концентрації 10 нг/мл, підготовлених відомим Способом підготовки зразків (зелений колір) та новим Способом підготовки проб меду для кількісного визначення сульфаніламідів (синій колір).**

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601