

Маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг тоон аргаар тодорхойлох аргыг боловсронгуй болгох

Пүрэвдоржийн Нямсүрэн¹, Дугарын Дэлгэрмөрөн¹, Пэлдэнгийн Болормаа¹, Болдын Баярмаа^{2*}

¹ Мал эмнэлгийн сургууль, ХААИС, Зайсан 17024, Улаанбаатар

² Эрдэм шинжилгээ, инновацийн алба, ХААИС, Зайсан 17024, Улаанбаатар

*Холбоо баригч зохиогч: bayarmaa_iao@mul.su.mn

 <https://orcid.org/0000-0002-6797-821X>

Хүлээн авсан: 01.10.2021

Хянасан: 11.12.2021

Хэвлэлтэд орсон: 31.12.2021

Хураангуй

Сүүлийн жилүүдэд, дэлхий дахинаа хүний хүнсэнд хэрэглэх малын гаралтай бүтээгдэхүүнд малын эмийн үлдэгдэл байхгүй байх нь аюулгүй хүнсний нэг гол үзүүлэлт гэж тодорхойлоод байгаа билээ. Монгол улсад малын гаралтай хүнсний бүтээгдэхүүнд эмийн үлдэгдлийг шинжлэх баталгаат арга зүйг практикт нэвтрүүлэх, арга зүйг өргөтгөх, шинжлэх эмийн үлдэгдлийн нэр төрлийг нэмэгдүүлэх зэрэг ажлууд нэн шаардлагатай байна.

Энэхүү судалгааны ажлын хүрээнд бид маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг өндөр ялгах чадвартай шингэний хроматографийн (ӨЯЧШХ) аргаар шинжлэх арга зүйг боловсрууллаа. Маханд антибиотикийн үлдэгдлийг ӨЯЧШХ-ийн аргаар тодорхойлох арга зүйг тогтоохдоо илрүүлэх хязгаар доод хязгаар, ажлын хүрээ болон шугаман чанар, нарийвчлал буюу давтац зэрэг үзүүлэлтүүдийг тогтоох замаар тодорхойллоо.

Түлхүүр үг: Эмийн үлдэгдэл, тетрациклин, өндөр ялгах чадвартай шингэний хроматографийн (ӨЯЧШХ) арга

Оршил

Мал эмнэлгийн практикт хэрэглэгдэж буй эмийн нэр төрөл, хэрэглээ жил ирэх тусам өсөн нэмэгдэж, эмийн зохистой хэрэглээ алдагдсанаар малын гаралтай хүнсний бүтээгдэхүүнд эмийн бодисын үлдэгдэл илрэх хандлагатай болж байна. Ингэж эмийн бодисын үлдэгдэл хүнсний бүтээгдэхүүнд илрэх нь хүний эрүүл мэндэд сөрөг нөлөөтэй [1]. Дэлхийн улс орнуудад төрөл бүрийн гаралтай хүнсний түүхий эд, бүтээгдэхүүнд малын эмийн үлдэгдлийг өндөр мэдрэмжтэй тоног төхөөрөмж ашиглан баталгаат аргаар шинжлэх, судлах ажлыг өргөн хүрээнд гүйцэтгэдэг [2,3].

Манай улсын хувьд малын эмийн үлдэгдлийг чанарын болон тоон шинжилгээний аргаар тодорхойлох судалгаа хийгдэж байгаа ч лабораторийн тоо, хүчин чадал сайтай тоног

төхөөрөмжийн хүрэлцээ, хангамж хангалтгүй байсаар байна. Ялангуяа, малын гаралтай хүнсний түүхийн эд, бүтээгдэхүүнд эмийн үлдэгдэл тодорхойлох өндөр мэдрэмжтэй шинжилгээний аргыг нэвтрүүлэх, түүний тохирсон баталгаат арга зүй боловсруулан үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэх нь нэн шаардлагатай байна [4].

Иймээс бид малын гаралтай хүнсний бүтээгдэхүүн болох маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг өндөр ялгах чадвартай шингэний хроматографийн (ӨЯЧШХ) аргаар тодорхойлох тохиромжтой арга зүйг боловсруулан түүнийг баталгаажуулах зорилт тавин энэхүү судалгааны ажлыг хийж гүйцэтгэлээ.

Материал, арга зүй

Урвалж, бодис

Судалгаанд окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклины стандартууд, гурван хлорт цууны хүчил (3 хлортэтанийхүчил, ГХЭХ, Trichloroethanoic acid, ТСА), гурван фторт цууны хүчил (ГЦФХ, Trifluoroacetic acid, ТФАА), метанол, ацетонитрил зэрэг өндөр цэвэршилттэй бодис урвалжуудыг ашиглалаа.

Дээж бэлтгэл

Шинжлэх махны дээжээс 1 гр-ыг жинлэн авч 50%-ийн ГХЭХ-ээр хандлан 1500г-д 5 минут

центрифугдээд дээд үеийг ялгаж авна. Үлдэгдлийг 0,1%-ийн ГЦФХ-ийн уусмалаар дахин хандалж, мөн 1500 г-д 5 минут центрифугдээд дээд үеийг авч өмнөх хэсэгтэй нийлүүлнэ. ӨЯЧШХ-ийн колонкыг метанол, нэрмэл ус, гурван хлорт цууны хүчил, ацетонитрил гүйлгэж бэлтгэсний дараа дээжийг гүйлгэж, 5 мл метанолд уусгана. Үүний дараа вакуум ууршуулагчаар нэрж, хуурай болтол ууршуулаад хуурай үлдэгдлийг метанолд уусган ӨЯЧШХ-ийн багажаар Хүснэгт 1-д заасан нөхцлийн дагуу шинжилгээ хийнэ [2,3].

Table 1

HPLC running condition

Detector	PDA/Photo diode array
Column	Shim pack GIST C18
Flow rate	0,7 ml/min
Injection volume	10 mkl
Column temperature	40°C
Wavelength	400-800 nm
Running time	27 min
Mobile phase A	0,05% Trifluoroacetic acid (TFA)
Mobile phase B	Methanol:Acetonitrile 1:1 (v/v)

Тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг тоон аргаар тодорхойлох аргыг боловсронгуй болгох

Маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг ӨЯЧШХ-ийн аргаар тодорхойлох аргыг боловсруулахдаа стандарт нэмэлтийн арга

ашиглан түүний сэргээгдэх чадварын хувийг тооцоолж, илрүүлэх хязгаар (Limit of detection), ажлын хүрээ буюу шугаман байдал (Working range/linearity) болон нарийвчлал буюу давтац (Accuracy) гэсэн үзүүлэлтүүдийг тодорхойлох замаар баталгаажуулна [5,6].

Судалгааны үр дүн, шүүн хэлэлцэхүй

Маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг ӨЯЧШХ-ийн аргаар тодорхойлох аргыг боловсруулахдаа арга зүйд заасан үзүүлэлтүүдийг тодорхойлж, баталгаажуулах ажлыг хийж гүйцэтгэв.

Илрүүлэх доод хязгаарын жиших муруйг байгуулах

Илрүүлэх доод хязгаар (ИДХ) жиших муруйг байгуулахынтулд стандарт тус бүрийг доорх хүснэгтэд үзүүлсэн концентрациар бэлтгэн арга зүйд заасны дагуу ӨЯЧШХ-ийн багажаар гүйлгэн тодорхойлов. Стандартуудын концентраци болон жиших муруйг дор үзүүлэв (Хүснэгт 2).

Table 2

Concentration of standard antibiotic solutions

Reserve solution / ppm /	Extraction solution / ppm /	Volume / μ l /	Solvent volume / μ l /	Total volume / μ l /	Solvent
A. Oxytetracycline					
200	10	250	4750	5000	100 % methanol
10	4	400	600	1000	
4	2	500	500	1000	
2	1	500	500	1000	
1	0,5	500	500	1000	20 % methanol
0,5	0,2	400	600	1000	
0,2	0,1	500	500	1000	
0,1	0,06 /LOD/	600	400	1000	
0,06	0,05	417	83	500	
B. Tetracycline					
200	10	250	4750	5000	100 % methanol
10	4	400	600	1000	
4	2	500	500	1000	
2	1	500	500	1000	
1	0,5	500	500	1000	
0,5	0,2	400	600	1000	20 % methanol
0,2	0,1	500	500	1000	
0,1	0,09	900	100	1000	
0,09	0,08	888,8	111,1	1000	
0,08	0,07/LOD	875	125	1000	
0,07	0,06	428,6	71,4	500	
C. Chlortetracycline					
200	10	250	4750	5000	100 % methanol
10	4	400	600	1000	
4	2	500	500	1000	
2	1	500	500	1000	
1	0,5	500	500	1000	20 % methanol
0,5	0,2 /ИДХ/	400	600	1000	
0,2	0,1	500	500	1000	

SD-standard deviation

LOD- limit of detection

Стандарт бодисын жиших муруйг байгуулахад 5 болон түүнээс дээш утгаар байгуулах шаардлагатай байдаг [3]. Иймд бид окситетрациклины стандартын жиших муруйг 7 өөр концентрациар (0.06-4 ppm) байгуулахад окситетрациклины стандартын илрэх доод концентрац 0.06 ppm байв. Тетрациклины

стандартын жиших муруйг 9 өөр утгаар (0.07-10 ppm) байгуулж, түүний илрэх доод концентраци нь 0.07 ppm байсан бол хлортетрациклины стандартын илрэх доод концентраци 0.2 ppm байв. Хлортетрациклины стандартын жиших муруйг 5 өөр утгаар (0.2-4 ppm) өгсөх дарааллаар уншуулж байгуулав (Зураг 1).

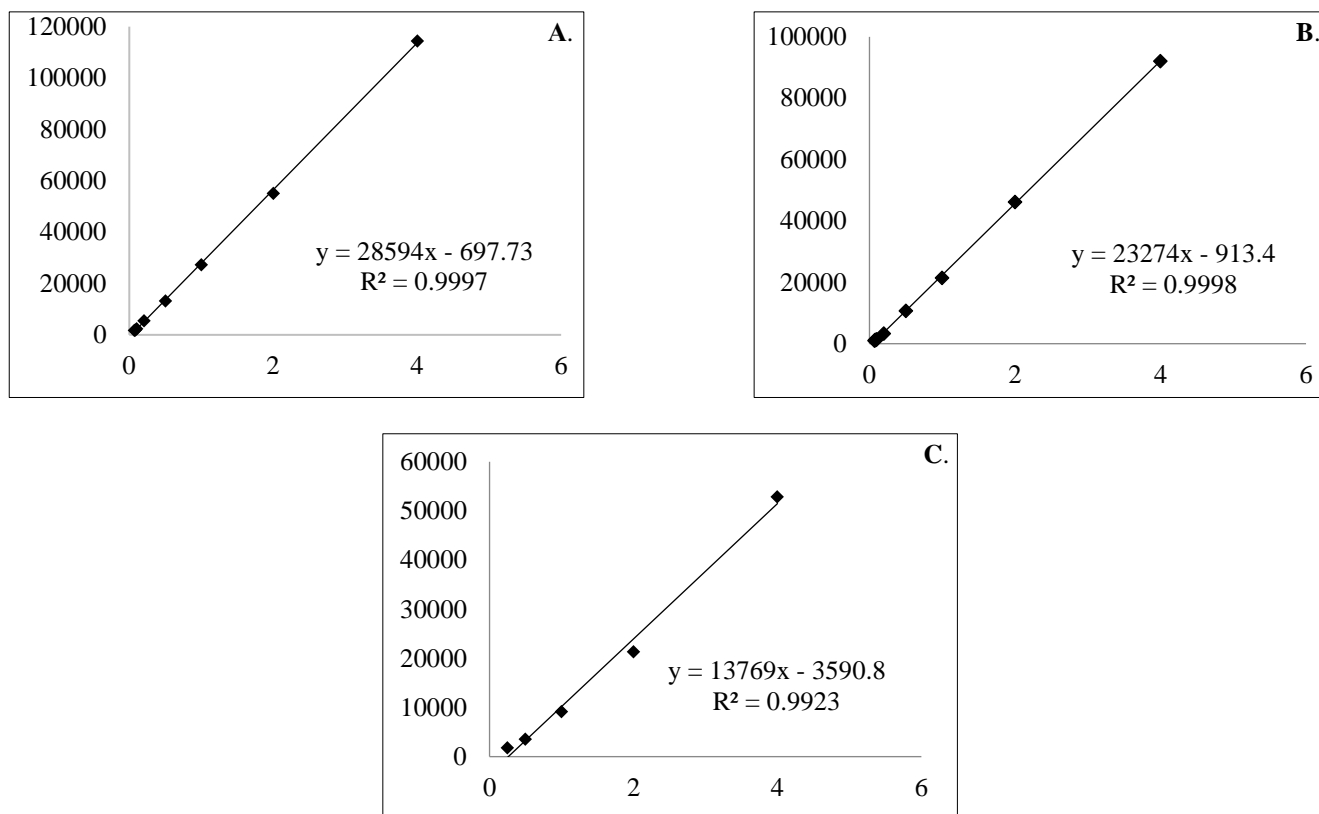


Figure 1. Standard solution curve
 (A. Oxytetracycline, B. Tetracycline, C. Chlortetracycline)

Стандартуудын жиших муруйгаар шугаман чанар тодорхойлох
 Стандарт уусмалын жиших муруйг байгуулахын тулд тухайн антибиотик стандарт уусмал бүрийг найруулахаас гадна мөн холимог байдлаар

бэлтгэн арга зүйд заасны дагуу ӨЯЧШХ-ийн багажаар гүйлгэж жиших муруй байгуулж, түүний шугаман чанарыг тодорхойлов (Хүснэгт 3).

Table 3

Determination of the linearity of standard antibiotic solutions

Linear regress	Determination coefficient /%/	SD	Correlation /R ² /	SD
A. Oxytetracycline				
y=26281x959.33	98.76		0.999	
y=26082x2735	97.69		0.9969	
y=28852x1633.2	99.96	0.55	0.9993	0.0006
y=29189x2586.7	99.99		0.999	
	99.10		0.99855	
	97.7-99.99		0.9969-0.999	
B. Tetracycline				
y=19941x3427	98.8		0.9938	
y=22875x2227.3	97.7		0.9884	
y=23215x944.36	100.0	0.3	0.9998	0.002
y=21213x2111.6	99.1		0.9953	
y=28334x1848.8	99.8		0.9992	
	99.1			
	97.7-100.0			

C. Chlortetracycline				
y=13476x2478.7	98.51		0.9925	
y=13598x3082.6	97.81		0.989	
y=13790x3658.5	98.37	0.15	0.9918	0.0007
y=12538x3392.6	98.37		0.9918	
	98.26			
	97.81-98.51		0.989-0.9925	

SD –standard deviation

Ажлын хүрээ буюу шугаман байдлыг тодорхойлоход түүний корреляцийн коэффициент нь $R^2 = 0.995$ -аас дээш байхаар

заасан байдаг бөгөөд бидний гүйцэтгэсэн энэхүү шинжилгээний корреляцийн коэффициент бүгд 0.995 –аас дээш байлаа.

Сэргээгдэх чадвар болон таарцын үр дүн

Маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг ӨЯЧШХ-ийн аргаар шинжлэх арга зүйн аргын баталгаажилтыг хийхдээ хүнсний бүтээгдэхүүнд байх зөвшөөрөгдөх дээд хэмжээтэй уялдуулан [7,8] өөр төрлийн

концентраци бүхий стандарт нэмэлтийн арга ашиглан түүний сэргээгдэх чадварыг хувиар (%) -иар тооцоолон тогтоов. Үр дүнг Хүснэгт 4-өөр харуулав.

Table 4

Resilience and repeatability of antibiotics

Frequency	Sample concentration /ppm/	Test results /ppm/	Recovery /%/	Max-min value /Recovery %/	A	SD	CV /%/
Low concentration							
A. Oxytetracycline							
6	0.2	0.14-0.18	78	70-80	0.16	0.013	8.22
B. Tetracycline							
10	0.2	0.14-0.17	77	72-87	0.16	0.01	8.06
C. Chlortetracycline							
6	0.5	0.35-0.38	78	71-88	0.37	0.013	3.62
High concentration							
A. Oxytetracycline							
10	0.5	0.35-0.44	79	73-89	0.4	0.035	8.87
B. Tetracycline							
13	0.5	0.369548952	77.8	71-88	0.39	0.03	7.1
C. Chlortetracycline							
10	1	0.74-0.87	79	74-87	0.8	0.054	6.8

A-average

SD-standard deviation

CV-variation coefficient

Европын холбооноос гаргасан аргын баталгаажуулалт хийх арга зүйд вариацийн коэффициент (CV%) нь $\leq 20\%$, сэргээгдэх чадварын (Recovery) үр дүнгийн интервал нь 70-120% байх шаардлагатай гэж заасан байдаг [9]. Дээрх судалгаанаас үзэхэд окситетрациклины хамгийн бага концентраци 0.2 ppm-ийн сэргээгдэх чадварын дундаж 78%, вариацийн коэффициент

8.2% бол хамгийн дээд концентраци буюу 0.5 ppm -ийн сэргээгдэх чадварын дундаж 79%, вариацийн коэффициент 8.87% байна. Тетрациклины хувьд түүний бага концентраци 0.2 ppm-ийн сэргээгдэх чадварын дундаж 77%, вариацийн коэффициент 8% бол их концентраци буюу 0.5 ppm-ийн сэргээгдэх чадварын дундаж 77.8 %, вариацийн коэффициент 7.1 % байв.

Хлортетрациклины хамгийн бага концентраци 0.5 ppm-ийн сэргээдэх чадварын дундаж 78%, вариацийн коэффициент 3,62% байсан бол их концентраци буюу 1 ppm-ийн сэргээгдэх чадварын дундаж 79%, вариацийн коэффициент

6.8% байна. Эдгээр үр дүнгүүд нь Европын холбооноос гаргасан аргын баталгаажуулалт хийх арга зүйд тусгасан дээд үзүүлэлтүүдээс доогуур байгаа нь шаардлагад бүрэн нийцэж байна.

Дүгнэлт

1. Маханд тетрациклины бүлгийн антибиотикийн үлдэгдлийг ӨЯЧШХ-ийн аргаар тодорхойлох сонгомол, тохиромжтой арга зүй боловсрууллаа.
2. ӨЯЧШХ-ийн аргаар тодорхойлох арга зүйг тогтоох шинжилгээний хүрээнд тетрацилин, окситетрацилин, хлортетрациклины стандартуудын жиших муруйгаар тэдгээрийн шугаман чанарыг тодорхойлоход бүх стандартуудын корреляцийн коэффициент нь 0.995-аас дээш байв.
3. Тетрацилин, окситетрацилин, хлортетрациклины стандарт уусмалуудын ӨЯЧШХ-ийн багажаар илэрч болох боломжит доод концентрацийн хэмжээг тогтоолоо.
4. Стандарт нэмэлтийн арга ашиглан түүний сэргээгдэх чадварыг хувиар (%) -иар тооцоолон тогтооход тэдгээрийн вариацийн коэффициент (CV%) сэргээгдэх чадварын (Recovery) үр дүнгийн интервал зохистой хэмжээнд байна.

Ашигласан бүтээлийн жагсаалт

1. Wendy A.Bedale, "Veterinary drug residues in foods of animal origin" Chemical hazards in foods of animal origin, Frans J.M. Smulders, Ivonne M.C.M. Rietjens and Martin Rose, ECVPH Food safety assurance, Volume 7, Wageningen Academic Publishers, p.55-70, 2019, https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3_02
2. Z. Zahreddine, et al., "HPLC-DAD multi-residue method for determination of florfenicol, penicillin and tetracycline residues in raw cow milk", Journal of Clinical and Laboratory Research, 2(3), 2021, <http://doi.org/10.31579/jclr.2021/017>
3. Pena, et.al. "Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection", J. Agric. Food. Chem., 53, 3784-3788, 2005
4. Мах, сүү, үр тариа, төмс хүнс ногоонд хүнсний аюулгүй байдлын судалгаа, эрсдлийн үнэлгээ шинжлэх ухаан төслийн тайлан, 2012-2013 он, УМЭАЦТЛ
5. S.R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams "Eurachem/CITAC guide CG4 Quantifying measurement uncertainty in analytical measurement", April, 2000
6. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods, June 2012
7. V.F. Samanidou, K.I. Nikolaidou, I.N.Papadoyannis, Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC, J Sep Sci., 30(15):2430-9.2007, <http://doi.org.10.1002/jssc.200700057>
8. Хүнсний бүтээгдэхүүн дэх малын эмийн үлдэгдлийн зөвшөөрөгдөх дээд хэмжээ SAC/MRL 2:2017
9. European commission "European Union Decision 2002/657/E", 2002

Improvement of the quantitative determination of tetracycline antibiotic residues in meat

Nyamsuren Purevdorj¹, Delgermurun Dugar¹, Bolormaa Pelden¹, Bayarmaa Bold^{2*} 

¹ School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Zaisan 17024, Ulaanbaatar, Mongolia

² Research and Innovation Office, Mongolian University of Life Sciences, Zaisan 17024, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: bayarmaa_iao@mul.s.edu.mn

 <https://orcid.org/0000-0002-6797-821X>

Received: 01.10.2021

Revised: 11.12.2021

Accepted: 31.12.2021

Abstract

In recent years, the absence of veterinary drug residues in animal products for human consumption has been identified as one of the key indicators of food safety. In Mongolia, there is an urgent need to introduce a certified methodology for the analysis of drug residues in animal products. In the framework of this study a methodology for the analysis of residues of tetracycline antibiotics in meat using HPLC method was developed. For the development of the method, the minimum detection limits, the scope of work and linearity, accuracy or frequency were established.

Keywords: Drug residue, tetracycline, high-performance liquid chromatography (HPLC)