

**Олена ЛИХОЛАТ,
Олена ВИШНІКІНА**

КОНТРОЛЬ ЗАЛИШКОВИХ ГОРМОНАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ У ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ

В Україні питання якості та безпеки сільськогосподарської продукції регламентуються Законами "Про ветеринарну медицину" та "Про безпечність та якість харчових продуктів". Останнім визначено, що безпечним є такий харчовий продукт, який не створює шкідливого впливу на здоров'я людини безпосередньо чи опосередковано за умов його виробництва та обігу з дотриманням вимог санітарних заходів та споживання (використання) за призначенням. Цим Законом передбачаються принципи та порядок здійснення державного контролю і нагляду. Важливим є також те, що особам, які займаються виробництвом або введенням в обіг харчових продуктів, забороняється виробляти та/або вводити в обіг небезпечні, непридатні до споживання або неправильно марковані харчові продукти. Закон також вимагає, щоб ці особи застосовували санітарні заходи та належну практику виробництва, системи *НАССР* та/або інші системи забезпечення безпечності та якості під час виробництва та обігу харчових продуктів. Ефективність належної практики виробництва та системи *НАССР* зростає, якщо вони інтегровані в систему менеджменту якості, побудованої згідно вимогам стандартів ДСТУ ISO 22000 : 2005 і ДСТУ ISO 9001: 2001.

Організацією, яка встановлює стандарти щодо якості продуктів харчування, є Комісія з *Codex Alimentarius*. Основною метою розроблення стандартів для харчових продуктів є захист здоров'я споживачів, забезпечення дотримання чесних правил ведення торгівлі продуктами харчування та сприяння координації всієї роботи стосовно стандартів на харчові продукти, що виконується міжнародними урядовими та неурядовими організаціями.

Безпека продуктів харчування є пріоритетом на всіх стадіях харчового ланцюга, який охоплює ланки від сільського господарства до продавців. Відповідальність за безпеку продуктів харчування беруть на себе перш за все виробники, які повинні враховувати харчові ризики [1].

У зв'язку зі вступом України до Всесвітньої Торговельної Організації виникла необхідність гармонізації ветеринарних вимог до якості продукції тваринного походження, оскільки існує небезпека ввозу до країни продукції, що не відповідає стандартам безпеки.

Мета статті – аналітичний огляд з проблеми можливого забруднення ветеринарної продукції, зокрема м'яса, гормональними препаратами та сучасних експертних методів, що пропонуються для детермінації їх залишкових кількостей.

У сучасному промисловому тваринництві, птахівництві й рибистві при інтенсивних технологіях вирощування тварин, у порушення технологічних регламентів, часто незаконно застосовують шкідливі для здоров'я людини гормональні стимулятори росту й тиреостатики, тому що вони значно підвищують продуктивність. Використання гормональних активних стимуляторів росту (гормонів) у сільськогосподарських тварин здатне збільшити виробництво телятини та яловичини до 15 %.

Яловичина й продукція з неї є важливим джерелом харчування в багатьох країнах. Методи її виробництва змінюються і включають застосування гормональних компонентів для збільшення росту й тканин зі зменшеним вмістом жиру у великій рогатій худобі. Гормональні компоненти поділяють на: *естрогенні* (17 β -естрадіол і його етери; зеранол), *андрогенні* (тестостерон і етери; тренболон ацетат), *прогестогенні* (прогестерон; меленгестрол ацетат).

Як представлено в доповіді Наукового комітету Європейської комісії із захисту прав і здоров'я споживачів від 30.04.1999 р., продукція, яка вміщує ветеринарні препарати, вкрай небезпечна для здоров'я людини: гормональні стимулятори росту – стильбени, стероїдні гормони мають канцерогенну активність, викликають порушення статевого дозрівання та репродуктивної здатності, а тиреостатики порушують функцію щитовидної залози й викликають алергію. Наприклад, зеранол, який широко використовувався як анаболічний стимулятор, був офіційно заборонений у Європі через небезпеку його потенційного канцерогенного й ендокринного ефекту, що порушує біологічні процеси [2].

Диетилстильбестрол належить до групи стильбенів, які є високоефективними синтетичними анаболічними стероїдами. Їм притаманна також сильна естрогенна активність. Диетилстильбестрол і близькі йому естрогени часто використовуються у тваринництві як стимулятори росту. На відміну від природних стероїдів вони не відразу руйнуються в печінці, а їхні залишки зберігаються в м'ясних продуктах. Доведено, що диетилстильбестрол має виражені канцерогенні властивості. Виявлення високого рівня диетилстильбестролу в деяких продуктах для дитячого харчування стало стимулом для ухвалення

рішення про заборону використання всіх стильбенів як речовин, що стимулюють ріст. Диетилстильбестрол викликає цілу низку важких негативних наслідків, виявлених у жінок, що підпали під його дію під час вагітності, та їх дітей. Використання стильбенів у тваринництві й птахівництві, імпорт і реалізація продуктів тваринного походження, що містять їхні залишкові концентрації, заборонені в Російській Федерації та в країнах Європейського союзу.

Застосування найнебезпечніших гормональних стимуляторів росту (стильбенів, тиреостатиків, природних і синтетичних стероїдних гормонів) для вирощування тварин суворо заборонено в переважній кількості країн і постійно контролюється уповноваженими органами державного ветеринарного нагляду відповідно до Директив ЄС 89/662/ЕЕС, 90/425/ЕЕС і 96/23/ЄС та ін. щодо ветеринарного й зоотехнічного контролю живих тварин і продуктів тваринного походження (табл. 1).

Таблиця 1

**Перелік речовин, заборонених до використання
як стимулятори росту**

Класи сполук	Заборонені речовини
Стильбени	Гексоестрол, диенестрол, диетилстильбестрол
Тиреостатики	Тіоурацил, метилтіоурацил, пропілтіоурацил, фенілтіоурацил, тапазол
Стероїди	17 β -естрадіол, тестостерон, прогестерон, етинілестрадіол, метилтестостерон, тренболон, α -нортестостерон, нандролон, болденон, станозолол, меленгестрол, медроксипрогестерон
Будь-які інші речовини, що відносяться до класів стильбенів, тиреостатиків та стероїдів	

У Європейському союзі заборонено виробництво й імпорт яловичини та продукції, отриманих від худоби, вирощеної із застосуванням гормонів. Методи оцінки можливих несприятливих ефектів на людей, що споживають такі продукти, включають аналіз достовірних кількостей гормонів у контексті їхньої біологічної діяльності й травних, поглинаючих, постпоглинаючих і видільних процесів. Спеціальні дослідження спрямовані на ефекти низьких концентрацій гормональних компонентів у м'ясних виробках у дітей в препубертатному періоді, ентерогепатичну інактивацію, клітинні рецептори й нерцепторні медіаторні процеси та визначення потенціалу впливу на ріст, розвиток і фізіологічні функції у споживачів. Особливе побоювання викликає 17 β -естрадіол як канцерогенна речовина в деяких тканинах. Доведено, що деякі катехол-метаболіти можуть викликати вільнорадикальне ушкодження ДНК у клітині й тест-системах лабораторних тварин. Вважають, що класичний естроген-рецепторний посе-

редник стимулює проліферацію клітин, які підтримують сприйняття. Математичні моделі, що описують кількісні відносини між споживанням малих кількостей естрогенів у м'ясі на додаток до більших концентрацій від ендogenous виробництва, хімічна стехіометрія на клітинному рівні й людській патології не одержали поки належного розвитку. Такий підхід необхідний для встановлення "молекулярної матеріальності" додаткового споживання гормону за відносною оцінки ризику. Інші гормони на визначення потенційно несприятливих ефектів менш досліджені. Обмеження досліджень міжнародною угодою із застосування "попереджувального принципу" та неприйняття європейською Комісією рекомендацій *Codex Alimentarius* призвели до рішення, відповідно до якого м'ясо великої рогатої худоби, вирощеної із застосуванням гормонів, безпечно для споживачів [3].

Однак у різних країнах регулювання щодо використання таких гормонів дуже відрізняється. Так, у Європейському союзі існує повна заборона на їхнє використання на відміну від Сполучених Штатів Америки, де застосування деяких гормонів дозволено при дотриманні суворих умов. Проте у деяких країнах-членах ЄС існує досить великий чорний ринок. Для США немає доказів існування такого чорного ринку. У ЄС число нелегально використовуваних гормонів становить від 35-ти до 55-ти [4]. У США законно застосовуються всього шість гормонів. Рівні залишків гормону, знайдених у яловичині, виробленої в США, у більшості випадків нижчі Максимальної залишкової межі, рекомендованої Експертним комітетом з харчових добавок (JECFA) Об'єднаної продовольчої й сільськогосподарської організації / Всесвітньої організації охорони здоров'я (FAO/WHO) [5; 6].

Унаслідок повної заборони в ЄС усіх гормональних активних стимуляторів росту при вирощуванні великої рогатої худоби, на відміну від їхнього легального використання (наприклад, таких загальних гормонів, як 17β -естрадіол, тестостерон, прогестерон, тренболон і зеранол, а також меленгестрол ацетату для добавки до кормів телиць і рактопаміну – для свиней у США), регулювальний контроль також суттєво відрізняється в ЄС і США.

У ЄС введення гормонів тваринам для забою є порушенням, що регулюється інспекційними програмами. У США в інспекційних програмах нормується максимальний залишковий рівень у тканинах, уживаних у їжу, – м'язах, жирі, печінці або нирках. Інспекційні програми ЄС зосереджені на типових матеріалах, зокрема сечі або волоссі, які найкращі для того, щоб перевірити тварин на використання заборонених речовин, особливо якщо тварини усе ще перебувають на фермі. У разі забою тварин більш схвалені типові матеріали – жовч, кров, очі, іноді печінка. Тільки в деяких випадках проводиться інспекція вибіркового м'язового м'яса: це відбувається лише під час

контролю імпортованого або м'яса в м'ясних магазинах чи супермаркетах. Як наслідок, дані щодо концентрацій гормону в зразках м'язового м'яса на ринку ЄС дуже обмежені й отримані переважно за результатами малих програм. До того ж у ЄС відсутні законодавчо встановлені природні рівні гормонів у зразках тваринницької продукції. Дані з інспекції зразків тканин тварин, яким незаконно вводили гормони, типово перебувають у діапазоні від декількох мікрограмів на кілограм (ppb) до декількох десятків мікрограма на кілограм. У ЄС незаконно використовується досить велика кількість гормонів, і число активних складів усе ще розширюється. Крім естрогенного, андрогенного й прогестагенного складів, а також тиреостатичних, кортикостероїдних і β -адренергічних компонентів, що використовуються окремо, вони застосовуються в "сильних" комбінаціях, що дає підставу припустити ймовірність споживання в ЄС високо забрудненого м'яса великої рогатої худоби [6].

Після світового форуму WHO у листопаді 2007 р. Пекінська Декларація визнала важливість безпеки продовольства поряд із правами всіх індивідумів на безпечне й адекватне харчування. Для ідентифікації основних генераторів небезпеки Урядовою хімічною лабораторією (LGC, Велика Британія) ретроспективно проаналізовано зразки продовольства зі 117 країн. Найбільше правопорушень виявилось в зразках із Китаю, Туреччини, Ірану [7]. Китай переважав як країна-порушник [8]. Зважаючи на об'єм імпортованої продукції, у т. ч. продовольчої, що надходить до України, зокрема з Європи та Китаю, безперечно, необхідно посилити контроль щодо безпеки продовольчих товарів.

Експертний комітет з харчових добавок (JECFA) FAO/WHO і адміністрація з продовольства й наркотиків США (FDA) ухвалили в 1988 р., що залишки гормонів, які виявляються в м'ясі від тварин, безпечні для споживачів. Однак, у світлі недавніх наукових досліджень, зі спеціальним акцентом на рівнях естрадіолу у дітей у препубертатному періоді, висновок JECFA щодо безпеки залишків естрадіолу в м'ясі базується на недоведених припущеннях і неадекватних наукових даних. Причина полягає в такому:

1) дані про рівні залишкових гормонів у м'ясі базувалися на дослідженнях, виконаних у 1970–80-х роках при використанні радіоімуннологічних методів, чутливість яких була дуже малою для точного виміру низьких рівнів гормонів, знайдених у тканинах тварин, і відмічено значні розбіжності між різними радіоімунними методами для виміру стероїдів;

2) подавалася лише обмежена інформація про кількість різних метаболітів стероїдів, незважаючи на факт, що метаболіти також можуть мати біологічну активність;

3) відсутні об'єктивні дані стосовно щоденних рівнів продукції стероїдних гормонів у здорових препубертатних дітей;

4) недооцінюється можливе біологічне значення дуже низьких рівнів естрадіолу [9–11].

Для оцінки потенційного ризику споживання гормонів варто взяти до уваги й інші продовольчі продукти. Наприклад, з яйцями споживається значно більше естрадіолу, ніж з яловичиною, незалежно від того, легально чи нелегально одержувала тварина гормони: курячі яйця є головним джерелом 17α - і 17β -естрадіолу в щоденній дієті споживача [5; 6].

Методи аналізу, формально затверджені відповідно до міжнародних узгоджених протоколів, є недостатніми, і перевірка тварини усе ще відіграє ключову роль в офіційній методології. Розвитку аналітичної методології частково перешкоджає обмежена придатність деяких калібровочних матеріалів, хоча ця ситуація поступово поліпшується. Нові інструкції в Європейському союзі дали поштовх розвитку й затвердженню хімічних методів аналізу. Об'єднані зусилля в європейському контексті тепер спрямовані на істотне поліпшення цієї ситуації, зокрема, удосконалення методів типу рідинної хроматографії-мас-спектроскопії для визначення залишкових гормональних препаратів у харчових продуктах тваринного походження [12].

В Україні в 2009 р. прийнято Закон № 1446-VI "Про Загальнодержавну цільову економічну програму проведення моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин у живих тваринах, продуктах тваринного походження і кормах, а також у харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі, на 2010–2015 роки". Відповідно до Закону в Україні повинна бути вдосконалена матеріально-технічна база державних лабораторій ветеринарної медицини, розширена сфера їх акредитації згідно зі стандартом ISO/IEC 17025, що визначає вимоги до компетентності випробувальних і калібрувальних лабораторій, розроблені та впроваджені підтверджувальні методи здійснення контролю тощо [13].

Зокрема, для визначення залишків зеранолу, який у невеликих кількостях може бути присутнім у тканинах сільськогосподарських тварин, пропонується використання методів тонкошарової хроматографії, газової хроматографії/мас-спектрометрії, рідинної хроматографії. Подібні методи є досить чутливими, проте потребують для проведення багато часу, і є вартісними, тому можуть застосовуватися як арбітражні, а не як експресні/моніторингові.

Для швидкого й чутливого аналізу визначеного зразка пропонується імунологічне дослідження, що має практичні переваги перед звичайними інструментальними методами при швидкому аналізі

залишків гормональних препаратів. Імунохімічні методи типу ELISA прості, швидкі й рентабельні, з адекватною чутливістю та специфікою для виявлення малих молекул [2].

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) ґрунтується на двох принципових наукових відкриттях. Перше полягає в здатності ензимів і антитіл, ковалентно або нековалентно пов'язаних із твердою основою, зберігати свою функціональну активність, тобто розщеплювати субстрат (ферменти) і зв'язувати антигени/антитіла; друге базується на створенні комплексу антитіло-фермент (Ab-F) у вигляді кон'югата, що зберігає свою біологічну активність у розчині. Ab-F-кон'югати характеризуються найвищою специфічністю й чутливістю, що досягає 97–99 %. Існує кілька модифікацій ІФА: 1. ELISA (*enzyme linked immunoadsorbent assay*) – метод визначення за допомогою імуносорбентів, пов'язаних з ферментами; 2. EIA (*enzyme immunoassay*) – метод на основі фермент-імуновизначення; 3. ЕМІТ (*enzyme multiplied immunoassay technique*) – спосіб, заснований на зв'язку з ферментами. Перші дві модифікації (ELISA і EIA) – це методи гетерогенного або твердофазного аналізу, а третій різновид (ЕМІТ) є гомогенним ІФА. Метод ІФА зразу ж знайшов широке застосування в області імуногістохімії, імунології, медицини й ветеринарії. Сьогодні цей метод використовується для визначення широкого класу речовин: гормонів, онкомаркерів, лікарських препаратів у різних біологічних субстратах, наркотиків, бактерій, вірусів і антитіл проти них [14].

Зараз метод ІФА став доступним завдяки своїй невисокій вартості та екологічній безпеці, що перевело його до розряду стандартних аналізів. За однією методикою пробопідготовки виконується аналіз на 6 різних гормонів (естрадіол, етинілестрадіол, тестостерон, метилтестостерон, тренболон, 19-нортестостерон).

Для прикладу наведемо визначення 17β -естрадіолу в м'ясі й сироватці крові тварин. Постійне вироблення 17β -естрадіолу починається в період полового дозрівання й триває до періоду вгасання полові функції. Звичайна концентрація 17β -естрадіолу в плазмі телиць становить 1–2 пг/мл. У період вагітності або при нелегальному використанні 17β -естрадіолу його вміст у плазмі підвищується до 100–1000 пг/мл. Для визначення 17β -естрадіолу використовуються інструментальні фізико-хімічні методи аналізу – такі як рідинна хроматографія високого тиску (ВЕРХ-SP) і хромато-мас-спектрометрія (ГХ-МС). Наприклад, відповідно до системи національного моніторингу, прийнятої в Німеччині, аналітичні методи контролю 17β -естрадіолу повинні мати чутливість не гірше, ніж 0,1 мкг/л у сироватці крові [15]. Метод ІФА задовольняє таким умовам (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристика тест-системи, що пропонується для визначення залишкових концентрацій 17 β -естрадіолу в м'ясі та сироватці

Підготовка проб	Затрати часу	Чутливість визначення
<i>М'ясо</i> : гомогенізація, екстракція, центрифугування, переекстракція, випарювання, розчинність, твердофазна екстракція	Підготовка 10 проб – 1 год	М'ясо – 0.05 мкг/кг (50 ppt)
<i>Сироватка крові</i> : екстракція, виморажування, випарювання, розчинність	Аналіз (незалежно від кількості проб) – 2.5 год	Сироватка крові – 0.02 мкг/л (20 ppt)
Перехресна чутливість, %		
17 β -естрадіол		100
Естрадіол-3-бензоат		50
Тренболон		1
Інші речовини		<1

Таким чином, зважаючи на обсяги та кількість поставок продовольства в сучасному суспільстві, неможливо гарантувати, що всі харчові продукти є безпечними для споживачів. Завдяки сучасному удосконаленню контролю, постійному зниженню забруднення в кожному пункті від виробництва продовольства та обробки до підготовки й споживання, безпека продовольчих товарів зростає. Проте для зменшення ризику порушень здоров'я людини, що викликані споживанням харчових продуктів, зокрема тваринного походження, необхідно досягти самих високих вимог їхньої безпеки та оптимізації методів експертної оцінки продукції.

Перспективами подальших досліджень є розвиток імуноаналізу для контролю якості ветеринарної продукції, що, можливо, спрямовуватиметься на скорочення часу аналізів і їх спрощення. Ці завдання частково можуть вирішуватися за рахунок застосування твердих носіїв із розвиненою поверхнею, які забезпечують підвищення відношення числа імунореактивних центрів до обсягу проби. Такі тверді носії, які відрізняються легкістю й необоротністю іммобілізації та являють собою надійний і зручний матрикс, можуть з'явитися в результаті більш тісного співробітництва матеріалознавців та імунохіміків.

Можливо також, що сполучення сучасних високочутливих методів виявлення з ІФА приведе до створення імуносенсорних пристроїв. Такі імуносенсори, що вже одержали високу оцінку в науковій літературі, зараз починають випускати в промисловому масштабі. Вони мають бути інструментом, здатним після додавання декількох крапель проби безпосередньо показувати кількість обумовленої речовини в пробі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мельничук С. Безпечні продукти – умова СОТ / С. Мельничук, Р. Гончар // Агросектор. — 2007. — № 9. — С. 1—5.
2. Wang S. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products : a review / S. Wang , X. H. Wang // Food Addit Contam. — 2007. — Jun; 24 (6). — P. 573—582.
3. Galbraith H. Hormones in international meat production: biological, sociological and consumer issues / H. Galbraith // Nutr. Res. Rev. — 2002. — Dec; 15 (2). — P. 293—314.
4. Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective / [J. Serratos, A. Blass, B. Rigau at al.] // Rev. Sci. Tech. — 2006. — Aug; 25 (2). — P. 637—653.
5. Stephany R. W. Hormones in meat: different approaches in the EU and in the USA / R. W. Stephany // APMIS Suppl. — 2001. — Vol. 103. — P. 357—363; discussion P. 363—364.
6. Stephany R. W. Hormonal growth promoting agents in food producing animals / R. W. Stephany // Handb Exp Pharmacol. — 2010. — Vol. 195. — P. 355—367.
7. Nepusz T. Network analytical tool for monitoring global food safety highlights China / T. Nepusz, A. Petróczi, D. P. Naughton // PLoS One. — 2009. — Aug. 18; № 4 (8). — P. 6680.
8. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials / [G. Alink, S. Barlow, A. Cockburn at al.] // Food Chem Toxicol. — 2008. — Mar; 46 Suppl 1. — P. 2—70.
9. Andersson A. M. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health / A. M. Andersson, N. E. Skakkebaek // Eur. J. Endocrinol. — 1999. — Jun; 140 (6). — P. 477—485.
10. Larrea F. Impact on human health of hormonal additives used in animal production / F. Larrea, M. Chirinos // Rev. Invest. Clin. — 2007. — May-Jun; 59 (3). — P. 206—211.
11. Brynes S. D. Demystifying 21 CFR Part 556-tolerances for residues of new animal drugs in food / S. D. Brynes // Regul. Toxicol. Pharmacol. — 2005. — Aug; 42 (3). — P. 324—327.
12. Van Egmond H. P. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context / H. P. van Egmond, R. C. Schothorst, M. A. Jonker // Anal Bioanal Chem. — 2007. — Sep; 389 (1). — P. 147—157.
13. Закон України № 1446-VI від 04.06.2009 "Про Загальнодержавну цільову економічну програму проведення моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин у живих тваринах, продуктах тваринного походження і кормах, а також у харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі, на 2010–2015 роки". — Режим доступу : <http://www.zakon.rada.gov.ua>.
14. Самуилов В. Д. Иммуноферментный анализ / В. Д. Самуилов // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — № 12. — С. 9—15.
15. RapiScreen. — Way of access : <http://www.analytica.ru/product.php>.