УДК 54.062:543,42.062
doi: 10.36359/scivp.2020-21-1.33

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ТИЛОЗИНУ У ЗРАЗКАХ ЯЄЦЬ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. І. Плотиця, С. М. Кіслова, наукові співробітники,
О. М. Паздерська, старший науковий співробітник

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна
dyanovych@scivp.lviv.ua

У статті представлено результати розробки та валідації методики підготовки проб яєць для визначення залишків тилозину методом імуноферментного аналізу із застосуванням наборів виробництва фірми Європроксіма (Нідерланди). Тилозин – природний антибіотик, високоефективний проти грампозитивних, та вибірково – проти грамнегативних організмів, який є продуктом мікробіологічного синтезу Streptomyces fradiae. Безвідповідальне використання антибіотиків та недотримання періодів витримування тварин після їх застосування, призводять до загострення проблем, пов'язаних із наявністю залишків антибіотиків у продуктах харчування. Біологічно обґрунтовані максимально допустимі рівні (МДР) вмісту залишкових кількостей антимікробних препаратів у продуктах тваринного походження, офіційно затверджені в усіх країнах світу Комісією Кодексу Аліментаріус, в Європейському Союзі – Регламентом ЄС № 37/2010, а в Україні – Наказом МОЗ України Про затвердження Показників безпечності харчових продуктів.

З метою забезпечення дотримання вищезгаданих норм, необхідно володіти чутливими та специфічними аналітичними методами, здатними швидко та ефективно контролювати наявність залишків на встановлених рівнях для рутинного контролю антибіотиків у яйцях ветеринарними та виробничими лабораторіями.

В роботі досліджено вплив різних умов екстрагування на відсоток витягу цільового аналіту з гомогенізованого зразка яєць, навантажених стандартним розчином: зміни pH різних буферних розчинів, різні ступені концентрування зразків, вплив окремих реагентів для кращого розділення водної та органічної фаз. Результати визначення кількісного вмісту тилозину в модельних зразках, розробленою методикою для скринінгу, підтверджено методом рідинної хроматографії із мас-спектрометричним детектуванням. Оптимальні умови вилучення цільового аналізу забезпечила методика підготовки зразків яєць за екстрагування 0,5 М калій фосфатним буфером з pH 8,0, з наступним переведенням аналіту в органічну фазу, з концентруванням аналіту шляхом висушування аліквоти органічного екстракту, та відновлення сухого залишку у буферному розчині, знежирюючи гексаном. Встановлено, що для кращого розділення фаз у системі "буфер – етилацетат" процедуру екстрагування та розділення фаз краще проводити за кімнатної температури. Результати досліджень представлено в таблицях та на хроматограмах.

Проведено валідацію запропонованого скринінг-методу та необхідний статистичний аналіз отриманих результатів: обчислено граничне значення або «технічний поріг» та фактор відсікання, представлено їх графічне зображення.

Основними перевагами розробленої методики є швидкість, простота виконання та чутливість до цільового аналіту на рівні 2 мкг/кг, що підтверджено статистично за результатами валідаційних випробувань. Методику запропоновано виробнику для розширення сфери застосування наборів.

Ключові слова: ТИЛОЗИН, ЯЙЦЯ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ.

THE DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR TYLOSIN RESIDUES DETERMINATION IN EGG SAMPLES USING THE METHOD OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

D. Yanovych, Z. Zasadna, M. Rydchuk, S. Plotycya, S. Kislova, O. Pazderska

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
dyanovych@scivp.lviv.ua

The article presents the results of development and validation of the method of eggs sample preparation for the determination of tylosin residues by enzyme-linked immunosorbent assay using the kits manufactured by Europroxima (Netherlands). Tylosin is a natural antibiotic, highly effective against gram-positive and selectively active against gram-negative organisms. It is a product of microbiological synthesis of *Streptomyces fradiae*. Irresponsible use of antibiotics and the non-compliance with the withdrawal period for animals after their use have escalated the problems associated with the presence of antibiotic residues in food. Biologically reasonable maximum permissible levels (MRLs) of residual antimicrobials in animal products, officially approved in all countries by the Commission of the Codex Alimentarius, in the European Union by EU Regulation № 37/2010, and in Ukraine by the Order of the Ministry of Health of Ukraine products.

In order to ensure the compliance with the above standards, it is necessary to have sensitive and specific analytical methods that can rapidly and effectively control the presence of residues at the established levels for routine control of antibiotics in eggs by veterinary and manufacturing laboratories.

The influence of different extraction conditions on the percentage of extraction of the target analyte from the homogenized eggs sample fortified with the standard solution was investigated: pH changes of different buffer solutions, different degrees of sample concentration, the influence of separate reagents for the better separation of aqueous and organic phases. The results of the quantitative analysis of tylosin content in the model samples, determined by the developed screening method, were confirmed by liquid chromatography with mass spectrometric detection. Optimal conditions for extraction of the target analyte from egg were provided by the sample preparation method using the extraction with 0.5 M potassium phosphate buffer with pH 8.0, followed by the analyte transfer into the organic phase, the concentration of the analyte by evaporation of an organic extract aliquot and the reconstitution of the dried residue in the buffer solution, degreasing with hexane. It was found that for the better phase separation in "buffer – ethyl acetate" system the procedure of extraction and phase separation is best carried out at room temperature. The research results are presented in tables and chromatograms.

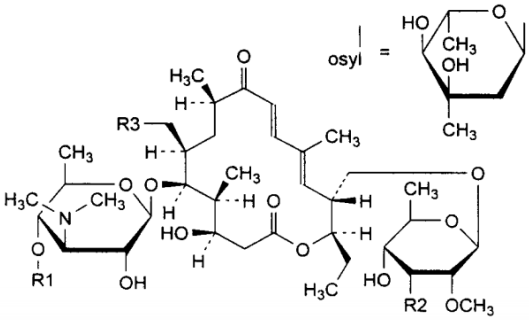
The proposed screening method was validated, the necessary statistical analysis of the obtained results was performed, and as a result, the limit value or “technical threshold” and the cut-off factor were calculated, and their graphical representation was presented.

The main advantages of the developed method are the rapidity, the simplicity of performance and the sensitivity to the target analyte at the level of 2 μg/kg, which is confirmed statistically by the

results of validation tests. The technique is offered to the manufacturer to expand the scope of the kits usage.

Keywords: TYLOSIN, EGGS, ELISA, METHOD VALIDATION.

Тилозин – природний антибіотик високо ефективний проти грам-позитивних, та вибірково проти грамнегативних організмів, який є продуктом мікробіологічного синтезу *Streptomyces fradiae,* з якого виокремлюють комплекс із чотирьох макролідів: тилозину А, який є основним компонентом (майже 90 % синтезованого продукту); тилозину В (десмікозину), С (макроцину) та D (реломіцину), наявних у різних відсоткових співвідношеннях (Botsoglou & Fletouris, 2001; Cornejo et al., 2018).



Name	Mol. Formula	R1	R2	R3
tylosin A	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	osyl	OCH_3	CHO
tylosin B	$C_{39}H_{65}NO_{14}$	H	OCH_3	CHO
tylosin C	$C_{45}H_{75}NO_{17}$	osyl	OH	CHO
tylosin D	$C_{46}H_{79}NO_{17}$	osyl	OCH_3	CH_2OH

Рис. 1. Хімічна структура тилозину (Botsoglou & Fletouris, 2001)

Тилозин належить до класу 16-членних макролідних антибіотиків, які часто використовують для лікування пневмонії, артриту та маститу великої рогатої худоби, мікоплазмових інфекцій птиці. До кінця минулого століття макроліди також застосовувалися в якості стимуляторів росту та бактеріостатичних кормових добавок для сільськогосподарських тварин (Lewicki, 2007).

Безвідповідальне використання антибіотиків та недотримання періодів витримування тварин після їх застосування, призвели до загострення проблем, пов‘язаних із наявністю залишків антибіотиків у продуктах харчування. Окрім потенційного токсичного впливу та збільшення частоти виникнення алергічних реакції у чутливих або сенсибілізованих споживачів, вони провокують розвиток стійких до антибіотиків бактерій і можуть викликати перехресну резистентність до інших антибіотиків подібної структури або механізму дії, що ускладнює лікування певних інфекції (Donoghue, 2003; Hekman, 2011). Біологічно обґрунтовані максимально допустимі рівні (МДР) вмісту залишкових кількостей антимікробних препаратів у продуктах тваринного походження, офіційно затверджені в усіх країнах світу Комісією Кодексу Аліментаріус, в Європейському Союзі – Регламентом ЄС № 37/2010, а в Україні – Наказом МОЗ України Про затвердження Показників безпечності харчових продуктів "Максимальні межі (рівні) залишків діючих речовин ветеринарних препаратів у харчових продуктах тваринного походження" (Commission Regulation, 2010; Codex Alimentarius, 2012). Для забезпечення дотримання вищезгаданих норм необхідно володіти чутливими та специфічними аналітичними методами, здатними швидко та ефективно контролювати наявність залишків на встановлених рівнях.

Аналітичні методи визначення залишків ветеринарних препаратів у харчових продуктах класифікують на скринінгові та методи підтвердження. Мікробіологічні методи найчастіше застосовують для скринінгу антимікробних залишків. Однак, перешкодою до

застосуванню цих методів є їх низька специфічність та наявність в яйці інгібуючих речовин, які служать природним захистом від мікробного забруднення та проліферації, що може бути причиною неправдиво позитивних результатів (Cantwell & O'Keefee, 2006; Hakimzadegan et al., 2014). Методи ультраефективної рідинної хроматографії у поєднанні з методами тандемної мас-спектрометрії (УЕРХ-МС/МС), можуть використовуватися не тільки для підтвердження результатів скринінгу, але й як напівкількісний постскринінг-метод, що забезпечує одночасну ідентифікацію аналітів та інформацію про відповідність аналізованих зразків встановленим регуляторним рівням (Hamscher et al., 2006; Błądek et al., 2012).

Рідинну хроматографію з УФ та / або флуорометричним детектуванням, як метод підтвердження, успішно застосовують для аналізу певних груп антибіотиків у яйцях. За останні роки метод рідинної хроматографії у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією (РХ-МС/МС) набув широкого розвитку для аналізу багатьох груп антибактеріальних сполук у продуктах тваринного походження. Саме метод РХ-МС/МС став одним з найбільш перспективних і ефективних для контролю вмісту заборонених речовин у яйцях, оскільки дає можливість одночасного виявлення цільових аналітів у найменших концентраціях з високою специфічністю, що є вимогою Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЄС до підтверджуючих методів (Commission Decision, 2002).

Метою нашого дослідження була розробка надійного і простого у використанні скринінг-методу для визначення вмісту тилозину у яйцях на рівні, передбаченому «Планом державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і непереробленних харчових продуктах тваринного походження» для рутинного контролю антибіотиків у яйцях ветеринарними та виробничими лабораторіями.

Матеріали і методи. В роботі використовували основне лабораторне обладнання для підготовки та аналізу зразків. Дослідження проводились на чистих (контрольних) зразках яєць від птиці з домашнього господарства, в якому не застосовували ветеринарні препарати що містять цільовий аналіт, та в яких не було виявлено залишків тилозину, згідно з попередніми дослідженнями. У роботі використано тест-набори фірми ЄвроПроксіма (Нідерланди) для визначення залишкових кількостей тилозину в продуктах тваринного походження, живих тваринах та кормах.

Для проведення досліджень методом УЕРХ-МС/МС застосовували рідинний хроматограф Waters ACQUITY UPLC H-Class з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Waters Xevo TQ-S Micro, обладнаний колонкою ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 µm, 50 mm x 2,1 mm) із передколонкою ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (1,7 µm, 5 mm x 2,1 mm) фірми Waters (США).

Використовували реактиви аналітичної якості: метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), воду високоочищену бідистильовану (система Milli-Q, Millipore), форміатну кислоту (Riedel-de-Haën), ацетонітрил (for HPLC, Sigma-Aldrich), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich), гексан (for HPLC, Lab-Scan), калій гідрофосфат (Riedel-de-Haën), натрій карбонат (Sigma-Aldrich), натрій цитрат (Riedel-de-Haën). Для побудови калібрувального графіка та навантаження зразків яєць використовували стандарт тилозину тартрату (Ningxia Tairui Pharmaceutical Co. Ltd), який містить 92,32 % тилозину А, згідно з сертифікатом. Основний стандартний розчин тилозину готували з первинною концентрацією тилозину А 1 мг/мл у метанолі. Наступні розчини стандарту тилозину з концентрацією тилозину А 100, 10, 1,0 та 0,1 мкг/мл готували послідовними розведеннями в метанолі, а 10 нг/мл тилозину А та нижчі концентрації – у 0,1 % форміатній кислоті в 30 % розчині метанолу. Розчини зберігали впродовж місяця у щільно закритому посуді в темному місці за температури 2-4 °С.

Параметри хроматографічної системи: мобільна фаза А – 0,1 % розчин форміатної кислоти у воді; мобільна фаза В – 0,1 % розчин форміатної кислоти у метанолі. Швидкість потоку – 0,4 мл/хв. Об'єм зразка – 10 мкл. Температура колонки – 40 °С. Час проведення розділення – 4 хв.

Розділення проводили за таким градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0.00	80	20
0.60	80	20
0.80	80	20
1.00	10	90
2.50	10	90
2.80	80	20
3.50	80	20

Час виходу тилозину А – 2,02 хв.

Параметри роботи мас-спекрометричного детектора:

Час інтегрування – 3.5 хв.

Іонне джерело – електророзпилювач (ESI).

Температура джерела (Source Temperature) – 150 °С.

Температура висушування (Desolvation Temperature) – 600 °С.

Газ зіткнення (Collision Gas) – аргон.

Тиск аргону – $3{,}8\times10^{-3}$ mbar.

Газ висушування (Desolvation Gas) – азот.

Потік газу висушування – 1000 L/hr

Газ розпилення (Nebulisation Gas) – азот.

Потік газу розпилення – 50 L/hr

Час сканування (Dwell) – 0,025 с.

Іонізація – ES+ (позитивна)

Режим сканування мас – MRM (режим моніторингу множинних реакцій)

Прекурсор-іон тилозину А – 916,7 m/z. Напруга конуса (Cone) – 30 V

Продукт-іони – 100,9 m/z (енергія зіткнення Collision 52 V); 174,1 m/z (Collision 40 V); 772,6 m/z (Collision 32 V).

Визначення вмісту тилозину А в зразках яєць (мкг/кг) проводили згідно з калібрувальними графіками, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати й обговорення. Протягом останніх п‘ятнадцяти років нами було верифіковано близько сорока тест-наборів реагентів для ІФА (ELISA) для визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів у продуктах тваринного походження. Верифікація тест-наборів та апробація їх в умовах контрольних лабораторій дозволяє більш повно оцінити придатність методики для випробувань безпечності продуктів харчування та кормів на відповідність методик вимогам Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів.

Згідно з наданими виробником параметрами, тест-набір дозволяє проводити визначення тилозину у зразках яєць на рівні 2,5 мкг/кг. Представлена виробником методика підготовки зразків яєць передбачає екстрагування аналіту 10 % розчином метанолу, з подальшим врівноваженням буферним розчином та наступним аналізуванням. Однак, при випробуванні зразків, навантажених цільовим аналітом, нами було виявлено, що запропонована процедура не забезпечує достатнього відсотку витягу, що не дозволяє визначити залишки тилозину на рівні нижчому за 3 мкг/кг, як це вимагається актуальним Планом державного моніторингу. Для досягнення відповідної чутливості методики необхідно

відділити аналіт від складної матриці зразка, багатої на альбуміни (яєчний білок) та ліпопротеїни (яєчний жовток), та провести його концентрування.

За літературними даними, тилозин легко переходить з матриці у водне середовище, однак для кожної матриці характерне певне значення pH буферного розчину для екстрагування. З метою вивчення впливу зміни pH екстрагуючого розчину на відсоток витягу досліджуваного аналіту нами було апробовано ряд методик підготовки зразків. Гомогенізовані зразки яєць навантажували на рівні 2 та 3 мкг/кг стандартним розчином тилозину з концентрацією 100 нг/мл, що надається в наборі. Екстрагування тилозину з навантажених зразків проводили буферними розчинами з pH від 8,0 до 10,0 з подальшим переведенням аналіту шляхом екстракції в органічну фазу (етилацетат) та концентрування зразка за допомогою висушування. В процесі дослідження проводили екстрагування аналіту такими буферними системами: фосфатним буфером pH 8,0; цитратним буфером pH 8,0; карбонатним буфером pH 9,0; фосфатним буфером pH 10,0. З метою кращого розділення водної та органічної фаз у випадку екстрагування цитратним буфером також було досліджено вплив додавання ацетонітрилу у водну фазу.

Результати дослідження підготовлених зразків представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати дослідження впливу зміни pH екстрагуючого розчину на відсоток витягу тилозину зі зразків яєць

№	Спосіб підготовки зразків	Навантаження, мкг/кг	Визначена концентрація аналіту, мкг/кг	R, %
1	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом	0	0,119	-
		2,0	1,73	80,6
		3,0	2,27	71,7
2	Екстрагування цитратним буфером з pH 8,0 та етилацетатом	0	0,216	-
		2,0	-	-
		3,0	2,42	73,5
3	Екстрагування цитратним буфером з pH 8,0 та етилацетатом з ацетонітрилом	0	0,111	-
		2,0	0,824	35,7
		3,0	0,775	22,1
4	Екстрагування карбонатним буфером з pH 9,0 та етилацетатом	0	0,705	-
		2,0	1,57	43,3
		3,0	2,62	63,8
5	Екстрагування фосфатним буфером з pH 10,0 та етилацетатом	0	0,121	-
		2,0	1,3	59
		3,0	1,74	54

Як видно з даних таблиці 1, найвищий відсоток витягу отримано за екстрагування аналіту 0,5 М калій фосфатним буфером з pH 8,0: 81 та 72 % за навантаження на рівні 2,0 та 3,0 мкг/кг, відповідно. Використання цитратного (pH 8,0) та карбонатного буферів (pH 9,0) не сприяло кращому витягу аналіту з навантажених зразків (74 та 64 % витягу для навантаження зразків на рівні 3,0 мкг/кг). Крім того, в обох випадках значно збільшувався матричний вплив у нульовому зразку: 0,216 та 0,705 мкг/кг для екстрагування цитратним та карбонатним буферами, відповідно. Додавання ацетонітрилу сприяло зменшенню впливу матриці зразка яйця, але також знизило відсоток витягу аналіту з навантажених зразків: 36 та 22 % для навантаження на рівні 2,0 та 3,0 мкг/кг, відповідно. Додавання ацетонітрилу також сприяло кращому розділенню фаз в системі “буфер – етилацетат” після екстрагування. За екстрагування аналіту зі зразків з концентрацією 2 і 3 мкг/кг фосфатним буфером з pH 10 витяг становив 59 та 54 %, відповідно.

Для подальших досліджень вибрано спосіб підготовки зразків з використанням 0,5 М калій фосфатного буферу з pH 8,0. Розглянуто такі варіанти підвищення ефективності розробленої методики: 1) покращення розділення водної та органічної фаз шляхом додавання

різних об’ємів ацетонітрилу; 2) зниження межі кількісного визначення, і, відповідно, підвищення чутливості методики шляхом зменшення об’єму буферу для відновлення сухого залишку. Результати дослідження представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати порівняльних досліджень впливу модифікацій розробленої методики на відсоток витягу тилозину з навантажених зразків яєць

№	Спосіб підготовки зразків	Навантаження, мкг/кг	Визначена концентрація аналіту, мкг/кг	R, %
1	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом	0	0,226	-
		2,0	2,16	96,7
		3,0	2,66	81,1
2	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом, з додаванням 0,5 мл ацетонітрилу	0	0,201	-
		2,0	1,68	74
		3,0	2,72	84
3	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом, з додаванням 1,0 мл ацетонітрилу	0	0,207	-
		2,0	1,75	77,2
		3,0	3,52	110,4
4	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом, зменшення об’єму буферу для відновлення сухого залишку	0	1,56	-
		2,0	7,75	309,5
		3,0	10,35	293

Додавання ацетонітрилу до суміші для екстрагування сприяло кращому розділенню водної та органічної фаз. Однак, це не підвищило відсоток витягу аналіту зі зразків: 96,7 та 81,1 % для зразків без додавання ацетонітрилу, 74 та 84 % – з додаванням 0,5 мл ацетонітрилу, 77,2 та 110,4 % – для зразків з додаванням 1,0 мл ацетонітрилу. За зменшення об’єму буферу у два рази значно зріс матричний вплив зразка яйця на результати дослідження: з 0,226 до 1,56 мкг/кг – для контрольних зразків, з 2,16 до 7,75 мкг/кг – для зразків, навантажених на рівні 2,0 мкг/кг, та з 2,66 до 10,35 мкг/кг – для зразків, навантажених на рівні 3 мкг/кг.

Оптимальні умови вилучення цільового аналізу забезпечила методика підготовки зразків яєць за екстрагування 0,5 М калій фосфатним буфером з pH 8,0, з наступним переведенням аналіту в органічну фазу, з концентруванням аналіту шляхом висушування аліквоти органічного екстракту, та відновлення сухого залишку у буферному розчині, знежирюючи гексаном. Встановлено, що для кращого розділення фаз у системі “буфер – етилацетат” процедуру екстрагування та розділення фаз краще проводити за кімнатної температури.

Запропоновану процедуру підготовки зразків яєць випробовували також підтверджуючим методом ультрависокоефективної рідинної хроматографії з тандем-мас-спектрометричним детектуванням (УЕРХ-МС/МС) з використанням приладу Waters Xevo TQ-S Micro. Для пробопідготовки за основу було взято методику екстрагування тилозину 0,5 М калій фосфатним буфером з pH 8,0 та 9,0 (спосіб 1 і 4, табл. 3), для кращого розділення вносили невелику кількість гексану (спосіб 3 і 6, табл. 3) або ацетонітрилу (спосіб 2 і 5, табл. 3). Після екстрагування органічним розчинником проводили концентрування аналіту за допомогою висушування з наступним відновленням сухого залишку у мобільній фазі (0,1 % форміатна кислота в 30 % метанолі), знежиривши зразок гексаном. Проводили аналіз чистих контрольних зразків та навантажених на рівні 2 мкг/кг стандартним розчином тилозину з концентрацією 100 нг/мл в перерахунку на тилозин А в метанолі. Встановлення відсотку витягу аналіту (R, %) із зразків проводилось за критерієм “додано – одержано”, використовуючи калібрувальний графік, побудований на стандартних розчинах тилозину в діапазоні концентрацій тилозину А від 0,1 до 5,0 нг/мл (рис. 2).

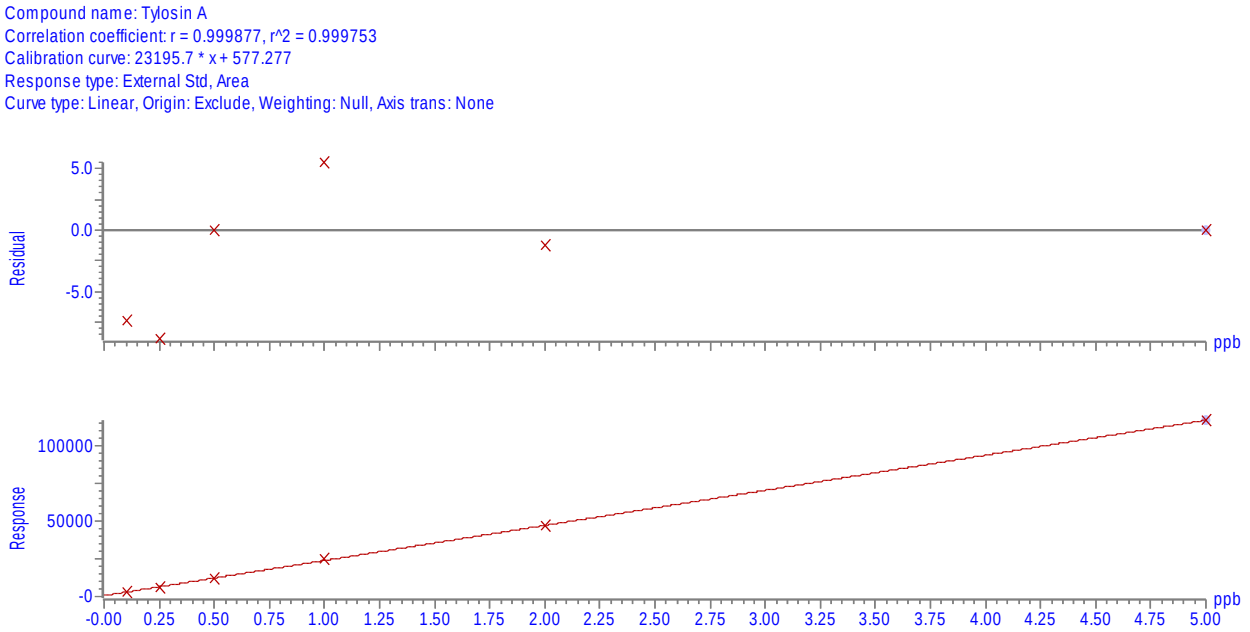


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення тилозину А в діапазоні концентрацій 0,1-5,0 нг/мл (R^2=0,9998).

Результати досліджень приведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Перевірка придатності розробленої методики пробопідготовки зразків яєць для визначення залишків тилозину А методом УЕРХ-МС/МС

№	Спосіб підготовки зразків	Додано тилозину А, мкг/кг	Одержано тилозину А, мкг/кг	R, %
1	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом	2	2,1	105
2	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом з додаванням 1,0 мл ацетонітрилу	2	1,33	66,5
3	Екстрагування фосфатним буфером з pH 8,0 та етилацетатом з додаванням 1,0 мл гексану	2	1,63	81,5
4	Екстрагування фосфатним буфером з pH 9,0 та етилацетатом	2	1,32	66,4
5	Екстрагування фосфатним буфером з pH 9,0 та етилацетатом з додаванням 1,0 мл ацетонітрилу	2	1,19	59,5
6	Екстрагування фосфатним буфером з pH 9,0 та етилацетатом з додаванням 1,0 мл гексану	2	1,48	74,0

У контрольних (не навантажених) зразках, отриманих з використанням усіх запропонованих методик пробопідготовки яєць, хроматографічних піків аналіту не спостерігали (рис. 3).

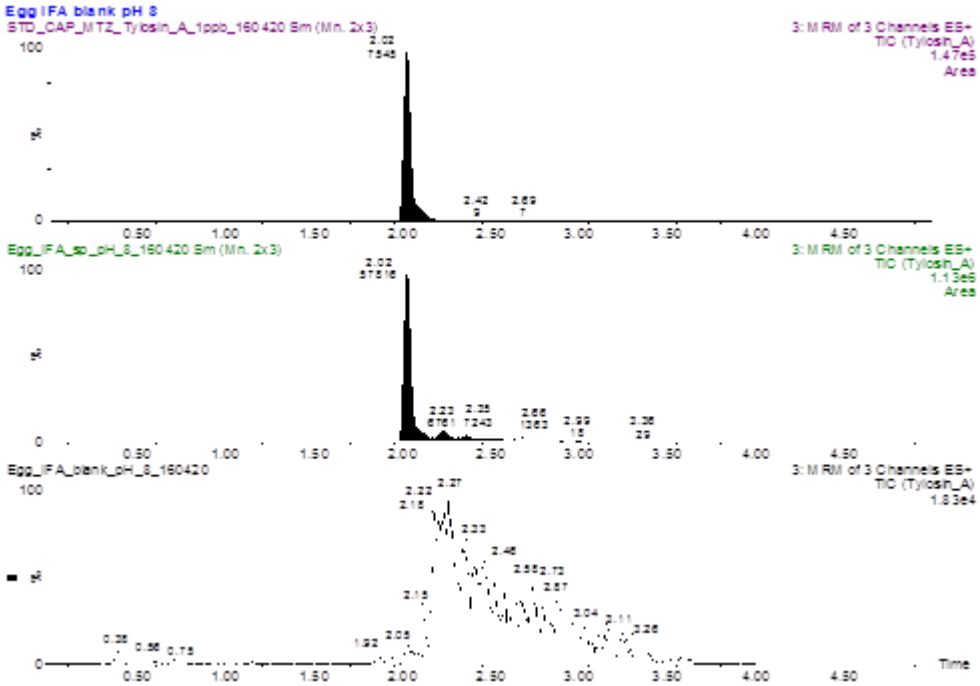


Рис. 3. Хроматограми екстрактів чистого зразка яйця та навантаженого тилозином А на рівні 2 мкг/кг, підготованих за використання 0,5 М калій фосфатного буферу з pH 8,0 з етилацетатом, а також стандартного розчину з концентрацією тилозину А 1,0 нг/мл.

Як видно з результатів, представлених у таблиці 3, найвищий відсоток витягу тилозину з навантаженого зразка яєць 105 % було встановлено за використання 0,5 М калій фосфатного буферу з pH 8,0 методики без додавання ацетонітрилу та гексану. Додавання ацетонітрилу знижувало відсоток витягу аналіту на 38 %, а гексану – на 23 %. У випадку екстрагування 0,5 М фосфатним буфером pH 9,0 додавання гексану збільшувало витяг з 66,4 до 74,0 %. Додавання ацетонітрилу в екстракційну суміш знижувало витяг до 59,5%, як і у попередньому випадку.

Наступним етапом нашої роботи було проведення валідації розробленої методики з метою експериментального підтвердження її придатності для отримання результатів з достатньою точністю та прецизійністю. Окрім цього, валідація дає змогу знизити кількість помилок у майбутньому під час рутинного використання методики, оскільки забезпечує розуміння її суті та дотримання головних параметрів; виявити та усунути недоліки методики ще на ранніх стадіях; оптимізувати та виділити робочі параметри; залучати до валідації інші випробувальні лабораторії, що посилює впевненість у методиці.

Оцінку придатності запропонованої методики проводили на зразках яєць птиці, попередньо перевірених на вміст досліджуваного аналіту. Попередньо ретельно гомогенізовані зразки контрольних (чистих) яєць навантажували зразків на рівні 2,0 мкг/кг з використанням стандартного розчину тилозину, що надається у наборі, з концентрацією 100,0 нг/мл. Встановлення відсотку витягу аналіту (R, %) із зразків проводилось за критерієм “додано – одержано”. Результати оцінки придатності методики визначення залишків тилозину у зразках яєць, наведено у таблиці 4.

Оцінку отриманих при валідації даних проводять з врахуванням 5 % похибки β та визначенні рівня відсікання за допомогою графічного подання здатності виявлення на рівні, передбаченому Планом державного моніторингу. Для кожного результату серії досліджень контрольних зразків визначено значення сигналу відповіді аналітичних реакцій, обчислено середнє значення відповіді та стандартне відхилення. За отриманими даними обчислено граничне значення або «технічний поріг».

Таблиця 4

Результати оцінки придатності методики визначення тилозину в зразках яєць, (n = 20)

Контрольні зразки				Зразки навантажені тилозином (2,0 мкг/кг)				
	OD	B/B0(%)	Conc		OD	B/B0(%)	Conc	R, %
M	1,87	92,68	0,2	M	0,94	46,38	2,93	136,82
SD	0,03	1,42	0,03	SD	0,03	1,31	0,19	9,23
M+SD*2,33	1,94	95,97	0,26	M+SD*1,64	0,98	48,52	2,62	
M-SD*2,33	1,81	89,38	0,13	M-SD*1,64	0,89	44,23	3,25	
CV%	1,55	1,53	13,5	CV%	2,84	2,82	6,52	2,36

Для кожного результату серії досліджень навантажених зразків, визначали значення сигналу відповіді аналітичних реакцій. Для серії цих зразків обраховано середнє значення відповіді, стандартне відхилення та за отриманими результатами обчислено фактор відсікання. На рисунку 4 графічно зображено технічний поріг та фактор відсікання методики для визначення залишкових кількостей тилозину в зразках яєць.

Рис. 4. Графічне зображення технічного порогу та фактору відсікання для методики ІФА для визначення залишкових кількостей тилозину у зразках яєць

Одержані результати підтверджують придатність методики для визначення вмісту залишків тилозину у зразках яєць на рівні 2,0 мкг/кг з вірогідністю одержаних даних на рівні 95 % з витягом 136 %.

Розробка методики підготовки складних матриць для визначення в них залишків ветеринарних препаратів пов'язана з певними аналітичними складнощами. Оскільки альбумін містить глікопротеїни у полярному середовищі, а яєчний жовток – ліпопротеїни в неполярному, це сприяє зв'язуванню досліджуваних аналітів різними компонентами системи при зміні pH, що, в свою чергу, впливає на зменшення витягу цільового аналіту. Концентрація залишків ветеринарних препаратів у певній частині яйця (білку та/або жовтку), в основному, залежить від фізико-хімічних властивостей досліджуваного аналіту, таких як молекулярна маса, структура та ліпо- чи гідрофільність. Деякими авторами приводяться дані, що водорозчинні аналіти мають більшу спорідненість до білкової частини, тоді як у жовтку – більша концентрація жиророзчинних аналітів (Furusawa, 2001). На думку інших: транспорт активних фармацевтичних інгредієнтів препаратів, а, відповідно, і їх розміщення у різних компонентах яйця, повністю залежить від процесу формування яйця (Kan & Petz, 2000;

Hekman, 2011). Різні автори вивчали фактори, що визначають розподіл антимікробних засобів між яєчним жовтком та білком; однак на даний момент єдиної думки немає (Vandenberge et. al., 2012; Munoz et. al, 2014).

Враховуючи гідрофільність тилозину, нами було запропоновано екстрагувати його з гомогенату яйця фосфатним буфером. За попередніми дослідженнями, проведеними зі зразками яєць з домашнього господарства, кращого розділення водно-сольової та органічної фаз досягали за попереднього охолодження зразків до 10 ºС та центрифугування за значного охолодження. Випробування проведене на яйцях промислового виробництва показало, що розділення водної та органічної фаз за вищезгаданих умов неможливе, що зменшує кількість органічного екстракту потрібного для аналізу. Додавання незначних об'ємів ацетонітрилу або гексану в екстракційну суміш буферу зі зразком покращувало розділ фаз, але зменшувало витягу аналіту з навантажених зразків. Попереднє нагрівання приготованого буферу до кімнатної температури та центрифугування за кімнатної температури сприяло кращому розділенню буферної та органічної фаз. Чутливість методики, досягнута за використання достатньо простої підготовки зразків, повністю задовольняє вимоги Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів щодо скринінг-методу визначення вмісту тилозину у зразках яєць (3 мкг/кг).

В И С Н О В К И

Розроблена методика, придатна для визначення залишкових кількостей тилозину на рівні 2 мкг/кг, була запропонована виробникові тест-набору для затвердження. Оформлено зміни до Методичних рекомендацій по кількісному визначенню залишків тилозину у зразках тканин, молока, меду, яєць, корму, сироватки крові та сечі конкурентним імуноферментним аналізом фірми ЄвроПроксіма (Нідерланди).

Перспективи досліджень. Розроблена методика підготовки зразків яєць для визначення залишкових кількостей тилозину дозволить виробничим та науковим лабораторіям проводити дослідження безпеки цієї продукції на рівні, передбаченому Планом державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і непереробленних харчових продуктах тваринного походження згідно з Наказом №1180 Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів від 05.12.2019.

References

Błądek Tomasz, Posyniak Andrzej, Gajda Anna, Gbylik Małgorzata, Żmudzki Jan (2012). Multi-class procedure for analysis of antibacterial compounds in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Bull Vet Inst Pulawy. 56. 321-327, DOI: 10.2478/v10213-012-0057-6.

Botsoglou, N.A. & Fletouris, D.J. (2001). Antimicrobial drugs. In: Drug Residues in Foods. Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. 27-115.

Cantwell, H. & O'Keefee, M. (2006). Evaluation of the Premi Test and comparison with the One-Plate Test for the detection of antimicrobials in kidney. Food Add Contam. 23, 120-125.

CODEX AIIMENTARIUS. (2012). Maximum residue limits for veterinary drugs in foods updated as at the 35th Session of the Codex Aiimentarius Commission, CAC/LMR 2. http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/7provide = standards &orderField=fullReference&sort=asc&numl =CAC/MRL. Accessed February 2014

COMMISSION DECISION 2002/657/EC of August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Commun 2002, L 221. 8-36.

COMMISSION REGULATION (UE) 37/2010 of 22nd December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. // Off J Eur Commun 2010, L 15. 1-72.

Cornejo, J., Pokrant, E., Carvallo, C., Maddaleno, A., San Martín, B. (2018). Depletion of tylosin residues in feathers, muscle and liver from broiler chickens after completion of antimicrobial therapy Food Additives & Contaminants: part A, 35, 3. 448–457 DOI: 10.1080/19440049.2017.1401740.

Donoghue, D. (2003). Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? Poult. Sci. 82, 618-621.

Furusawa, N. (2001). Transference of dietary veterinary drugs into eggs. Vet. Res. Commun. 25, 651-662.

Hakimzadegan, M., Khalilzadeh Khosroshahi, M., Hasseini Nasab, S. (2014). Monitoring of Antibiotic Residue in chicken eggs in Tabriz city by FPT Inter. J. of Advan. Biol. and Biomed. Res. 2, 1. 132-140.

Hamscher, G., Limsuwan, S., Tansakul, N., Kietzmann, M. (2006). Quantitative analysis of tylosin in eggs by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: residue depletion kinetics after administration via feed and drinking water in laying hens. J Agric Food Chem. 54, 24. 9017-9023.

Hekman, P.G. (2011). Schefferlie Kinetic modeling and residue depletion of drugs in eggs. Br. Poult. Sci. 52. 376-380.

Kan, C.A. & Petz, M. (2000). Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. J. Agric. Food Chem. 48. 6397-6403.

Lewicki Jacek. (2007). Tylosin. A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods 66th JECFA meeting. 1-39.

Munoz Ruben, Cornejo Javiera, Maddaueno Audo, Araya-Jordan Carouina, Iraguen Daniela, Pizarro Nicolas, Betty san Martin. (2014). Withdrawal times of oxytetracycline and tylosin in eggs of laying hens after oral administration. Journal o f Food Protection, 77, 6. 1017-1021. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-440.

Vandenberge, V., Delezie, E., Delahaut P., Pierret G., De Backer P., Daeseleire E., Croubels, S. (2012). Transfer of flubendazole and tylosin at cross contamination levels in the feed to egg matrices and distribution between egg yolk and egg white. Poult Sci., 91(5).1248-55. DOI: 10.3382/ps.2011-02071.