

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ТРИМЕТОПРИМУ У ЗРАЗКАХ ТКАНИН ІМУНОФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ

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

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

У статті представлено результати розробки способу підготовки зразків м'язових та паренхіматозних тканин для проведення подальшого дослідження на вміст залишкових кількостей триметоприму методом імуноферментного аналізу тест-наборами Trimethoprim фірми Kwinbon Biotechnology (Китай), призначеного для аналізу іншої цільової матриці, а саме – меду. Представлено результати порівняння методик підготовки зразків із застосуванням різних способів екстрагування аналіту з тканин, з установленим відсотком витягу. Запропоновано найбільш ефективні умови проведення екстрагування ацетонітрилом з використанням ультразвукової інтенсифікації, подальшим концентруванням аналіту шляхом висушування, відновлення сухого залишку та знежирення. Такий підхід дає змогу визначити залишки триметоприму в тканинах птиці на рівні 5-10 мкг/кг з абсолютним витягом майже 75%. Згідно з Рішенням Європейської Комісії 2002/657/ЕС, проведено валідацію запропонованої методики з урахуванням максимально допустимих рівнів (МДР) триметоприму в тканинах продуктивних тварин. Придатність методики підтверджено на основі встановлення основних валідаційних параметрів для скринінг-методів (технічного порогу та фактору відсікання) з використанням контрольних (чистих) та навантажених стандартним розчином триметоприму на рівні $\frac{1}{2}$ МДР зразків м'язових та паренхіматозних тканин курчат-бройлерів за критерієм «додано-одержано». Основними перевагами розробленої методики є простота виконання, експресність та економічна ефективність. Перевірку достовірності результатів, отриманих за допомогою розробленої методики, проведено з використанням підтверджуючого УЕРХ-МС/МС методу. У статті наведено результати порівняльного дослідження чистих зразків м'язових та паренхіматозних тканин курчат-бройлерів та навантажених на рівні $\frac{1}{2}$ МДР стандартним розчином триметоприму. Розроблена скринінг-методика імуноферментного аналізу рекомендується для визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках тканин та може бути використана для рутинних лабораторних досліджень, а також для вивчення періодів виведення залишків триметоприму з тканин продуктивних тварин після застосування ветеринарних лікарських засобів.

Ключові слова: ТРИМЕТОПРИМ, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, ТКАНИНИ, ІФА, УЕРХ-МС/МС, ВАЛІДАЦІЯ.

THE DEVELOPMENT AND THE VALIDATION OF THE METHOD FOR TRIMETOPRIM RESIDUES DETERMINATION IN TISSUES 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
dzasadna@scivp.lviv.ua

The article presents the results of the development of sample preparation method of muscle and parenchymal tissues for their further testing on trimethoprim residues by enzyme-linked immunosorbent assay using Trimethoprim test kits from Kwinbon Biotechnology (China), designed to analyze another target matrix, viz. honey. The results of the comparison of sample preparation methods with the use of different techniques of analyte extraction from tissues, with the established percentage of extraction are presented. The most effective conditions are proposed: acetonitrile extraction using ultrasonic intensification, subsequent concentration of the analyte by evaporation, reconstitution of dried residue and degreasing. This approach makes it possible to determine trimethoprim residues in poultry tissues at the level of 5-10 µg/kg with an absolute recovery of about 75%. In accordance with the Decision of the European Commission 2002/657/EC, the validation of the proposed method was carried out taking into account the maximum permissible levels (MRL) of trimethoprim in the tissues of productive animals. The suitability of the method was confirmed on the basis of establishing of the main validation parameters for screening methods (technical threshold and cut-off factor) using control (pure) and spiked with a standard solution of trimethoprim at the level of ½ MRL samples of muscle and parenchymal tissues of broiler chickens. The main advantages of the developed technique are simplicity of performance, rapidity and cost effectiveness. The certainty of the results obtained using the developed method was verified using the confirmatory UPLC-MS/MS method. The article presents the results of a comparative study of pure samples of broiler chickens muscles and parenchymal tissues and spiked at the level of ½ MRL with a standard solution of trimethoprim. The developed screening technique of enzyme-linked immunosorbent assay is recommended for determination of residual amounts of trimethoprim in tissue samples and can be used for routine laboratory tests, as well as to study the withdrawal procedure of veterinary drugs based on this drug.

Keywords: TRIMETOPRIM, RESIDUES, TISSUES, ELISA, UPLC-MS/MS, VALIDATION.

Триметоприм (5-[(3',4',5'-триметоксифеніл)метил]-2,4-піримідиндіамін) – представник класу 2,4-діамінопіримідину дигідрофолату, інгібітора редуктаз (рис. 1).

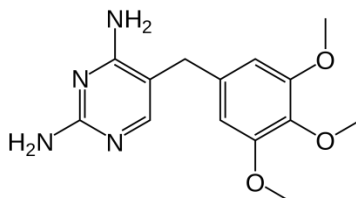


Рис. 1. Хімічна структура триметоприму

Триметоприм – перший комерційно успішний діамінопіримідин, який самостійно не використовують у клінічній практиці, а лише в поєднанні із сульфаніламидами у співвідношенні 1 : 5. Ветеринарні лікарські засоби на основі триметоприму застосовуються, як протипротозойні засоби, для профілактики та лікування кокцидіозу та лейкоцитозоонозу та

як антибактеріальні засоби проти інфекційних захворювань, особливо – дихальних шляхів та шлунково-кишкового тракту у людей та тварин. Механізм дії триметоприму пов'язаний з пригніченням ферменту дигідрофолатредуктази у процесі синтезу тетрагідрофолієвої кислоти. Це призводить до виснаження фолатів, основного кофактора синтезу нуклеїнових кислот, що впливає на зменшення продукції бактеріальних нуклеїнових кислот та білків. Ефект проявляється на етапі синтезу фолату – який є наступним у ланцюзі реакцій, які інгібують сульфаніламідів. При одночасному застосуванні триметоприму та сульфаніламідів спостерігається синергетичний ефект щодо пригнічення синтезу тетрагідрофолієвої кислоти (Pfeifer et al., 2002; Sayar et al., 2010; Varenina et al., 2016).

Абсорбція триметоприму з шлунково-кишкового тракту швидка і майже повна (90-100 %). Зв'язування з білками плазми становить 45 %, а максимальна концентрація у плазмі крові досягається через 1-4 год. Швидко розподіляючись у тканинах і рідині організму, включаючи нирки, печінку, селезінку, мокроту, слину і сперму, триметоприм потрапляє також у жовч, кістковий та губчатий мозок, але не компактний шар кісток. Концентрація у спинномозковій рідині становить 30-50 % від концентрації у сироватці крові, а у тканинах та секреті передміхурової залози вона у 2-3 рази вище від концентрації у сироватці крові. Метаболізується триметоприм у печінці (10-20 % – до неактивних метаболітів) (Baert et al., 2003; Amini & Ahmadiani, 2007; Biswas et al., 2007).

Відповідно до вимог Кодекс Аліментаріус (Codex Alimentarius, 2012) та Регламенту 37/2010/ЕС Європейського Союзу (European Council, 2010), затверджено біологічно обґрунтовані максимально допустимі рівні (МДР) вмісту залишкових кількостей триметоприму на рівні 50 мкг/кг у різних видах тканин продуктивних тварин (м'язи, жир, печінка, нирки). Перелічені нормативні акти та Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЕС (Commission Regulation, 2002) щодо основних критеріїв оцінки аналітичних методів та результатів, одержаних з їх використанням, є обов'язковими до виконання при розробці методик контролю, з метою забезпечення надійного захисту споживачів від надходження залишків антибактеріальних препаратів з продуктами тваринного походження. Запропонована методика повинна відповідати встановленим вимогам щодо чутливості, специфічності, експресності та ефективності, а також пройти усі етапи оцінки придатності для зазначених цілей.

Для визначення залишкових кількостей триметоприму у продуктах харчування використовують метод імуноферментного аналізу та методи підтвердження: переважно хроматографічні РХ-МС/МС або ВЕРХ-УФ/ФЛД (Brands et al., 1997; Wang et al., 2006; Pikkemaat et al., 2011; Hui Li et al., 2013; Abd Elkhabeer et al., 2020; Mohamed & Fouad, 2020).

Метою нашої роботи була розробка, апробація та впровадження методики підготовки зразків тканин (м'язових та паренхіматозних) для проведення скринінгових-досліджень продуктів тваринного походження на вміст залишків триметоприму.

Матеріали і методи.

Реактиви. Метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore), форміатна кислота (Riedel-de-Haën), ацетонітрил (for HPLC, Sigma-Aldrich), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich), амоній гідрофосфат (Sigma-Aldrich), аміак (Riedel-de-Haën), гексан (for HPLC, Lab-Scan), тетрахлорметан (Pestiscan, Lab-scan).

Стандарти. Стандарт триметоприму (Sigma-Aldrich, Vetranal analytical standart).

Основний стандартний розчин триметоприму з концентрацією 1,0 мг/мл готували у метанолі. Наступні стандартні розчини з концентрацією 100, 10, та 1,0 мкг/мл готували послідовними розведеннями у метанолі, а 100 нг/мл та нижчі концентрації – у 0,1 % форміатній кислоті в 30 % метанолі. Розчини стандартів зберігали впродовж двох місяців у щільно закритому посуді у холодильнику за температури 2-8 °С.

Обладнання. 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 \times 2,1 mm) із передколонкою ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (1,7 μm , 5 mm \times 2,1 mm) фірми Waters (США).

Приготування зразків. У роботі використано основне лабораторне обладнання для підготовки зразків. Дослідження проводили на зразках м'язових та паренхіматозних тканин контрольної птиці з домашнього господарства, в якому не застосовували ветеринарні препарати, що містять цільовий аналіт, та не виявлено залишкових кількостей триметоприму у попередньо проведених дослідженнях. Зразки очищали від сполучних тканин та ретельно подрібнювали гомогенізатором впродовж 3 хв. Імуноферментний аналіз проводили на тест-наборах КА06801Н *Trimethoprim* фірми Kwinbon Biotechnology (Китай) для визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках меду.

Приготування зразків для дослідження підтверджуючим методом VEPX-МС/МС. У поліпропіленову пробірку для центрифугування об'ємом 50 мл вносили 2 г гомогенізованого зразка, додавали 4,0 мл ацетонітрилу і 10 с струшували на вортексі. Пробірки витримували в ультразвуковій бані за кімнатної температури впродовж 15 хв, потім центрифугували впродовж 10 хв за швидкості 4700 rpm і температури 4 °С. Надосадову рідину переносили у поліпропіленову пробірку для центрифугування об'ємом 50 мл, додавали 10 мл 0,1 М буферного розчину з рН 4 та перемішували на вортексі впродовж 1 хв. У пробірку додавали 12 мл етилацетату, струшували на роторному шейкері за швидкості 60 rpm впродовж 20 хв і центрифугували впродовж 10 хв за швидкості 4700 rpm і температури 4 °С. Відбирали 12 мл верхньої органічної фази та переносили у скляну пробірку для випаровування. Екстракти висушували до сухого залишку за температури 40 °С у роторному випарювачі, а сухий залишок перерозчиняли у 500 мкл 0,1 % розчину форміатної кислоти в 30 % метанолі і струшували на вортексі впродовж 20 с. Для знежирення додавали 1,5 мл суміші гексану з тетрахлорметаном (1:1) і струшували на вортексі впродовж 20 с. Далі зразки переносили у мікропробірки типу «епендорф» і центрифугували впродовж 5 хв за 21000 g і температури 4 °С. У віали для хроматографічного аналізу переносили 200 мкл нижньої фракції. Фактор концентрування – 3.

Параметри роботи хроматографічної системи: мобільна фаза А – 0,1 % розчин форміатної кислоти у воді; мобільна фаза В – 0,1 % розчин форміатної кислоти у метанолі. Швидкість потоку – 0,6 мл/хв. Об'єм інжекції – 10 мкл. Температура колонки – 40 °С. Час розділення – 2,5 хв. Час виходу триметоприму – 0,38 хв.

Розділення проводили за градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0:00	75,0	25,0
0:09	75,0	25,0
0:10	5,0	95,0
0:75	5,0	95,0
0:80	75,0	25,0
2:00	75,0	25,0

Параметри роботи мас-спектрометричного детектора: іонне джерело – електро-розпилювач (ESI); режим іонізації – ES⁺; температура джерела (Source Temperature) – 150 °С; температура висушування (Desolvation Temperature) – 600 °С; газ зіткнення (Collision Gas) – аргон; тиск аргону: 4.0×10^{-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 s; режим сканування мас – MRM (режим моніторингу множинних реакцій).

Параметри сканування мас аналіту наведено у таблиці 1.

Параметри сканування мас триметоприму тандем-мас-спектрометричним детектором

Аналіт	Прекурсор-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Продукт-іон, m/z	Енергія зіткнення (Collision Energy), V
TMP	291,2	48	123,0	22
			230,1	22
			261,1	22

Визначення вмісту триметоприму в зразках м'язових та паренхіматозних тканин (мкг/кг) проводили згідно з калібрувальними графіками, побудованими на матриці чистого контрольного зразка, який за попередніми дослідженнями не містив аналіту, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати й обговорення. Набір *Trimethoprim* фірми Kwinbon Biotechnology розрахований на визначення залишкових кількостей аналіту лише у зразках меду. Проводячи огляд доступної наукової літератури, ми зауважили, що залишки триметоприму визначають одночасно з аналізом різноманітних матриць на вміст препаратів групи сульфаніламідів. Тому, відповідно, нами була вибрана для апробації методика підготовки зразків м'яса та печінки, запропонована німецькою фірмою-розробником наборів для скринінг-методу визначення залишкових кількостей групи сульфаніламідів R-Biopharm (Німеччина). Методика передбачає екстрагування сумішшю ацетонітрил : вода (у співвідношенні 84 : 16) та етилацетатом, з подальшим розділенням органічних фаз та концентруванням аналіту шляхом висушування.

Крім того, апробовано методику пробопідготовки зразків м'язових тканин для кількісного ВЕРХ-МС/МС визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму, запропоновану фахівцями фірми Thermo Fisher Scientific (Німеччина), яка передбачає екстрагування аналіту з гомогенізованих зразків сумішшю ацетонітрил : трихлороцтова кислота (у співвідношенні 45 : 55), розділення фаз шляхом центрифугування та концентрування аналіту висушуванням за температури 45 °C на роторному випарювачі (Bousova & Mittendorf, 2016). Методика зі статті (Andrée & Schwägele, 2007) пропонує екстрагування аналіту великим об'ємом дихлорметану, розділення фаз центрифугуванням та концентрування аналіту висушуванням, як описано вище, а також спосіб екстрагування ацетонітрилом, запропонований для визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму у зразках молока співробітниками нашої лабораторії (Yanovych et al., 2020). Екстрагування продовжували в ультразвуковій бані за кімнатної температури ще впродовж 10 хв. Цей спосіб підготовки зразків передбачає наступне екстрагування аналітів з органічної фази у водну (буферний розчин), з подальшим переведенням в іншу органічну фазу, з метою кращої очистки екстракту від речовин білкового походження.

Оскільки метод імуноферментного аналізу не вимагає такого високого ступеня очистки, то ми зупинились на етапі розділення твердої та рідкої фаз центрифугуванням та концентруванням аналіту шляхом висушування до сухого залишку. Після концентрування зразки, підготовані чотирма описаними вище методиками, знежирюють гексаном та відновлюють в екстракційному буфері, що надається в наборі. Результати, отримані за використання описаних вище способів підготовки контрольних (чистих) та навантажених зразків м'язових тканин, представлено в таблиці 2.

**Результати дослідження контрольних та навантажених зразків м'язових тканин
за використання різних способів підготовки**

Спосіб екстрагування аналіту	Навантаження зразка, мкг/кг	Визначено аналіту, мкг/кг	R, %
Екстрагування сумішшю ацетонітрил : вода (84 : 16) та етилацетатом (R-Biopharm)	0	1,37	-
	5	4,00	53
	10	6,85	55
Екстрагування ацетонітрилом (Yanovych et al., 2020)	0	2,1	-
	5	5,8	74
	10	9,7	76
Екстрагування сумішшю ацетонітрил : 2 % ТХО (45 : 55) (Bousova & Mittendorf, 2016)	0	1,42	-
	5	1,98	11
	10	2,72	13
Екстрагування дихлорметаном (Andrée & Schwägele, 2007)	0	0,62	-
	5	3,00	48
	10	5,61	50

За отриманими даними (табл. 2), з урахуванням матричного впливу, отриманого для чистого (контрольного) зразка, найвищий відсоток витягу (74 та 76 %) отримано для зразків, навантажених на рівні 5,0 та 10,0 мкг/кг стандартним розчином триметоприму, за застосування екстрагування ацетонітрилом, запропонованого нашою лабораторією для УЕРХ-МС/МС визначення залишкових кількостей препаратів групи сульфаніламідів та триметоприму у зразках молока (Yanovych et al., 2020). Використання ацетонітрилу для екстрагування аналіту одночасно сприяє ефективнішій денатурації білкових компонентів зразка, зменшуючи їх вплив на показники оптичної густини при проведенні імуоферментного аналізу і, відповідно, збільшуючи ступінь вилучення аналіту. Екстрагування в умовах ультразвукової бані забезпечує руйнування можливих зв'язків аналіту з пептидними компонентами матриці зразка, і крім цього, інтенсифікує процес екстракції.

Оскільки імуоферментний метод належить до скринінг-методів, призначених для рутинного аналізу продуктів харчування тваринного походження показників якості та - безпеки, а основними характеристиками таких методів є ефективність, експресність та мінімальні фінансові затрати, то для додаткової очистки зразків після концентрування аналіту ми вирішили, що достатньо застосовувати тільки знежирення гексаном.

За двоступінчастого екстрагування триметоприму сумішшю ацетонітрил : вода (84 : 16) та етилацетатом для навантажених зразків на рівні 5,0 та 10,0 мкг/кг, з урахуванням матричного впливу, відсоток витягу становив 53 та 55 %, відповідно. За достатньо низького відсотку витягу, ця методика також передбачає більші витрати часу (двоступінчасте екстрагування ацетонітрилом впродовж та етилацетатом до 20 хв) та реагентів (ацетонітрил та етилацетат). Ці два аспекти є критичними для скринінг-методик, які одночасно передбачають використання мінімальної пробопідготовки досліджуваних зразків та максимально високий відсоток витягу аналіту.

Застосування методики (Bousova & Mittendorf, 2016) та екстрагування дихлорметаном, з урахуванням матричного впливу, не дали достатнього витягу аналіту із навантажених зразків: 12 та 49 %, відповідно.

Для оцінки придатності методики використовували зразки м'язових тканин та печінки курчат-бройлерів контрольної групи, яким не випоювали дослідний препарат, і утримували окремо від дослідних груп птиці. Збагачення зразків до рівня цільової концентрації скринінгу проводили з використанням стандартного розчину триметоприму для навантаження, що надається у наборі, з концентрацією 1 мкг/мл. Для експериментального дослідження придатності методики встановлюють величину цільової концентрації скринінгу

(концентрацію, при якій скринінг-метод класифікує зразок як скринінг-позитивний). Для зареєстрованих препаратів ця величина знаходиться на рівні МДР або нижче (якщо дозволяє метод – то на рівні ½ МДР). У даному випадку МДР становить 50 мкг/кг для зразків м'язової тканини та печінки курчат, тому, відповідно, навантаження зразків проводилось на рівні ½ МДР – 25 мкг/кг. Згідно з вказаними виробником метрологічними характеристиками, цей тест-набір передбачає проводити дослідження триметоприму на рівні від 10 мкг/кг.

Для встановлення відсотку витягу аналіту (R, %) за критерієм «додано – одержано» використовували контрольні зразки м'язової тканини та печінки, навантажені на рівні 25 мкг/кг. Дослідження проводилось за такою схемою: гомогенізовані зразки тканин контрольних тварин розділяли на дві частини, одну частину збагачували додаванням стандартного розчину триметоприму на вказаному рівні. Підготовані чисті та збагачені триметопримом контрольні зразки готували за розробленою методикою та досліджували імуноферментним аналізом. Результати представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати оцінки придатності методики визначення триметоприму у зразках м'язових тканин курчат-бройлерів, (n = 20)

Контрольні зразки				Збагачені зразки 25 мкг/кг				
№	OD	B/B0(%)	Conc	№	OD	B/B0(%)	Conc	R, %
1	0,737	58,244	2,310	1	0,201	13,663	21,010	74,80
2	0,738	58,323	2,290	2	0,191	12,981	22,150	79,44
3	0,716	56,623	2,460	3	0,219	14,923	19,290	67,32
4	0,680	53,776	2,740	4	0,194	13,220	21,790	76,20
5	0,707	55,872	2,530	5	0,182	12,402	23,340	83,24
6	0,723	57,137	2,420	6	0,196	13,322	21,560	76,56
7	0,758	59,905	2,140	7	0,204	13,901	20,690	74,20
8	0,769	60,775	2,070	8	0,196	13,322	21,560	77,96
9	0,691	54,607	2,660	9	0,210	14,276	20,100	69,76
10	0,742	58,679	2,260	10	0,200	13,595	21,110	75,40
11	0,765	60,498	2,090	11	0,215	14,617	19,640	70,20
12	0,746	58,996	2,230	12	0,199	13,560	21,220	75,96
13	0,734	58,007	2,320	13	0,191	13,015	22,150	79,32
14	0,727	57,493	2,380	14	0,195	13,288	21,670	77,16
15	0,858	67,853	1,340	15	0,206	14,037	20,490	76,60
16	0,720	56,900	2,430	16	0,191	12,981	22,150	78,88
17	0,741	58,600	2,270	17	0,195	13,288	21,670	77,60
18	0,753	59,549	2,180	18	0,191	13,015	22,150	79,88
19	0,674	53,302	2,790	19	0,193	13,118	21,910	76,48
20	0,733	57,968	2,330	20	0,199	13,560	21,220	75,56
M	0,735	58,155	2,312	M	0,198	13,504	21,344	76,13
SD	0,039	3,066	0,303	SD	0,009	0,605	0,958	3,7
M+SD*2,33	0,826	65,299	3,018	M+SD*1,64	0,213	14,914	23,575	84,75
M-SD*2,33	0,645	51,012	1,606	M-SD*1,64	0,184	12,512	19,773	67,5
CV%	5,272	5,272	13,105	CV%	4,481	4,481	4,488	4,861

Одержані результати оцінки придатності методики визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках печінки курчат-бройлерів наведено у таблиці 4.

Обчислений відсоток витягу залишків триметоприму із зразків м'язової тканини і печінки становив 76,10 та 78,95 %, відповідно, що буде використано для розрахунку даних, одержаних у кінетичному експерименті. Технічний поріг методики (LOD) для виявлення залишків триметоприму у м'язовій тканині та печінці (M+SD*2,33) розраховано на рівні: 3,02 та 2,22 мкг/кг, відповідно. Середні значення вмісту залишків триметоприму у зразках м'язової тканини та печінки, збагачених аналітом на рівні 25 мкг/кг, становили 21,34 та 21,7 мкг/кг, відповідно. Одержані результати та проведені статистичні обчислення підтверджують

придатність методики для визначення вмісту залишків триметоприму у м'язовій та паренхіматозній тканині курчат-бройлерів на рівні МДР з вірогідністю одержаних даних на рівні 95 %.

Таблиця 4

**Результати оцінки придатності методики визначення триметоприму
у зразках печінки курчат-бройлерів, (n = 20)**

Контрольні зразки				Збагачені зразки 25 мкг/кг				
№	OD	B/B0(%)	Conc	№	OD	B/B0(%)	Conc	R%
1	0,718	55,125	2,100	1	0,187	13,222	23,790	86,76
2	0,729	55,931	2,030	2	0,202	14,321	21,190	76,64
3	0,733	56,276	1,990	3	0,211	14,924	19,960	71,88
4	0,735	56,430	1,980	4	0,199	14,108	21,650	78,68
5	0,707	54,242	2,180	5	0,202	14,321	21,190	76,04
6	0,738	56,622	1,960	6	0,220	15,597	18,900	67,76
7	0,712	54,626	2,140	7	0,206	14,605	20,620	73,92
8	0,722	55,432	2,070	8	0,173	12,230	27,240	100,68
9	0,738	56,622	1,960	9	0,205	14,498	20,760	75,20
10	0,755	57,965	1,850	10	0,208	14,747	20,350	74,00
11	0,745	57,159	1,920	11	0,209	14,817	20,220	73,20
12	0,747	57,313	1,900	12	0,199	14,108	21,650	79,00
13	0,734	56,315	1,980	13	0,185	13,080	24,210	88,92
14	0,734	56,315	1,980	14	0,195	13,825	22,300	81,28
15	0,773	59,309	1,740	15	0,210	14,853	20,090	73,40
16	0,720	55,240	2,080	16	0,189	13,400	23,390	85,24
17	0,745	57,198	1,910	17	0,187	13,258	23,790	87,52
18	0,740	56,814	1,940	18	0,226	16,023	18,260	65,28
19	0,754	57,889	1,850	19	0,191	13,541	23,010	84,64
20	0,747	57,313	1,900	20	0,199	14,108	21,650	79,00
M	0,736	56,507	1,973	M	0,200	14,179	21,711	78,95
SD	0,016	1,214	0,106	SD	0,013	0,900	2,084	8,23
M+SD*2,33	0,773	59,336	2,221	M+SD*1,64	0,221	16,277	26,567	98,13
M-SD*2,33	0,699	53,677	1,725	M-SD*1,64	0,179	12,703	18,293	59,77
CV%	2,149	2,149	5,389	CV%	6,349	6,349	9,600	10,43

Оцінку отриманих даних при валідації проводять з врахуванням 5 % похибки β та визначенні рівня відсікання за допомогою графічного подання здатності виявлення ССВ. Для кожного результату серії досліджень контрольних зразків визначають значення сигналу відповіді В1 аналітичних реакцій, обчислюють середнє значення відповіді для серії порожніх зразків В та стандартне відхилення SDb їх відповіді. В подальшому обчислюють граничне значення або «технічний поріг» Т:

$$T = B + 1,64 \times SDb$$

де: В – середнє значення відповіді;

SDb – стандартне відхилення значень контрольних зразків.

Для кожного результату серії досліджень збагачених зразків, визначають значення сигналу відповіді Y1 аналітичних реакцій. Для серії збагачених зразків обраховують середнє значення відповіді М та стандартне відхилення SD їх відповіді. Для методу ІФА відповідь В/В0 % (відсоток відношення оптичного густини одержаного значення до стандартного зразка з нульовою концентрацією аналіту) обернено-пропорційно до одержаної концентрації. Тому:

$$Fm = M + 2,33 \times SD$$

де: М – середнє значення відповіді;

SD – стандартне відхилення значень збагачених зразків.

Як видно з рисунків 2 та 3, між середнім значенням відповіді холостих зразків В та технічним порогом рівень помилково-позитивних результатів скринінгу більший за 5%. Відповідно, здатність виявлення методики відповідає критерію $CC\beta > B$, що узгоджується з Рішенням Європейської Комісії 2002/657/ЕС.

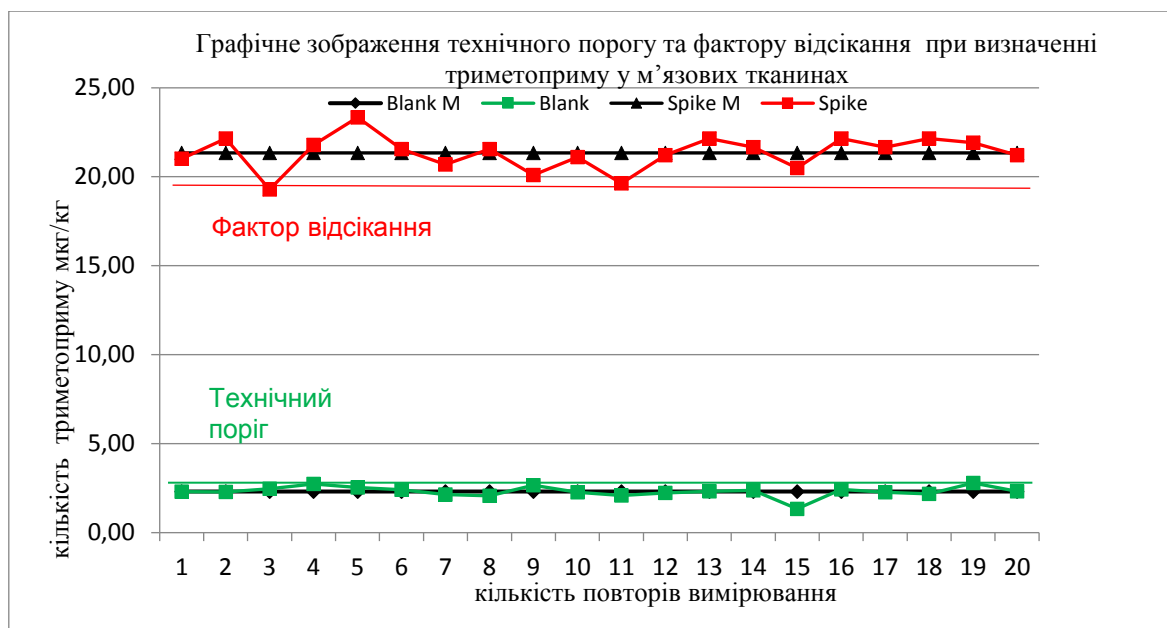


Рис. 2. Графічне зображення технічного порогу та фактору відсікання для визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках м'язових тканин курчат-бройлерів

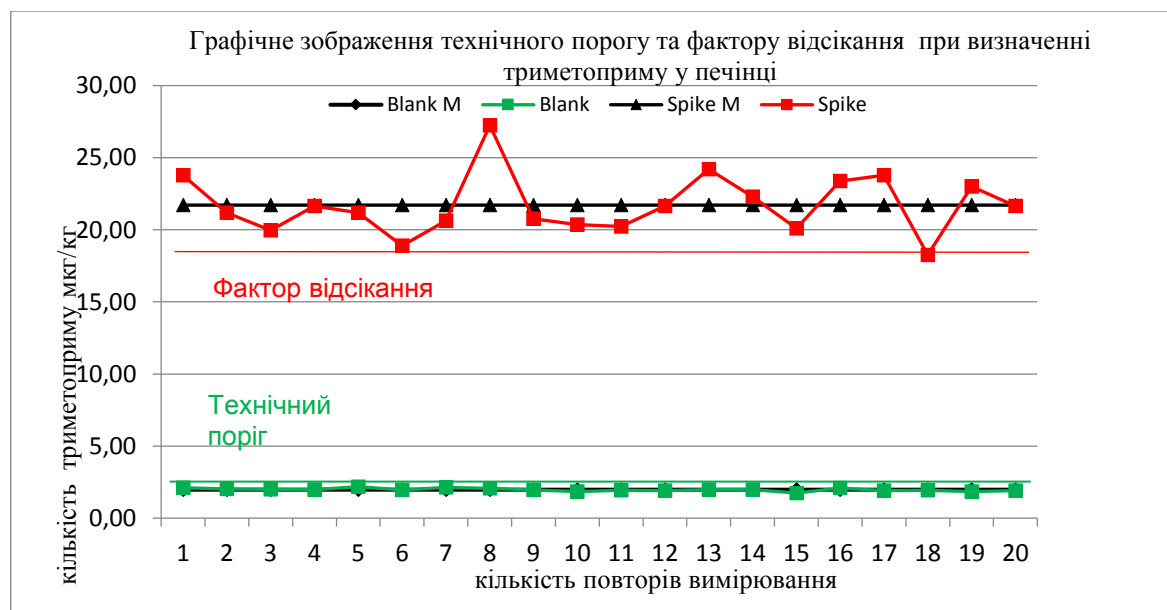


Рис. 3. Графічне зображення технічного порогу та фактору відсікання для визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках печінки курчат-бройлерів

Отже, розроблена методика визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках м'язових та паренхіматозних тканин за чутливістю відповідає вимогам встановлених МДР та відсотку витягу, що повністю відповідає вимогам до скринінг-методів. Представлені результати валідації підтверджують придатність методики для рутинного аналізу продуктів тваринного походження та може бути також використана в процедурі встановлення каренції ветеринарних лікарських засобів з організму цільових тварин.

Оскільки, за отримання позитивного результату при скринінг-аналізі, необхідно проводити додаткове дослідження методом підтвердження, то методом УЕРХ-МС/МС ми проаналізували чисті (контрольні) зразки м'язів та печінки і навантажені на рівні 25 мкг/кг за методикою, яка послужила основою для розробки цього способу підготовки зразків. Деякі валідаційні параметри застосованої УЕРХ-МС/МС методики визначення залишків триметоприму в тканинах м'язів та паренхіматозних органів наведено в таблиці 5.

Таблиця 5

Деякі валідаційні параметри УЕРХ-МС/МС методики визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках м'язів і печінки

Зразки	Межа детектування LOD, мкг/кг	Межа визначення LOQ, мкг/кг	Межа прийняття рішення СС α , мкг/кг	Здатність виявлення СС β , мкг/кг
М'ясо	0,25	0,5	50,4	52,6
Печінка	0,4	0,8	52,4	59,7

Так, на рис. 4 наведено хроматограми підготованих екстрактів чистих зразків м'язових тканин та печінки курчат, а також навантажених триметопримом на рівні 25 мкг/кг, а на рис. 5 та 6 – калібрувальні графіки, побудовані на відповідних контрольних матрицях в діапазоні концентрацій аналіту від 0 до 50 мкг/кг.

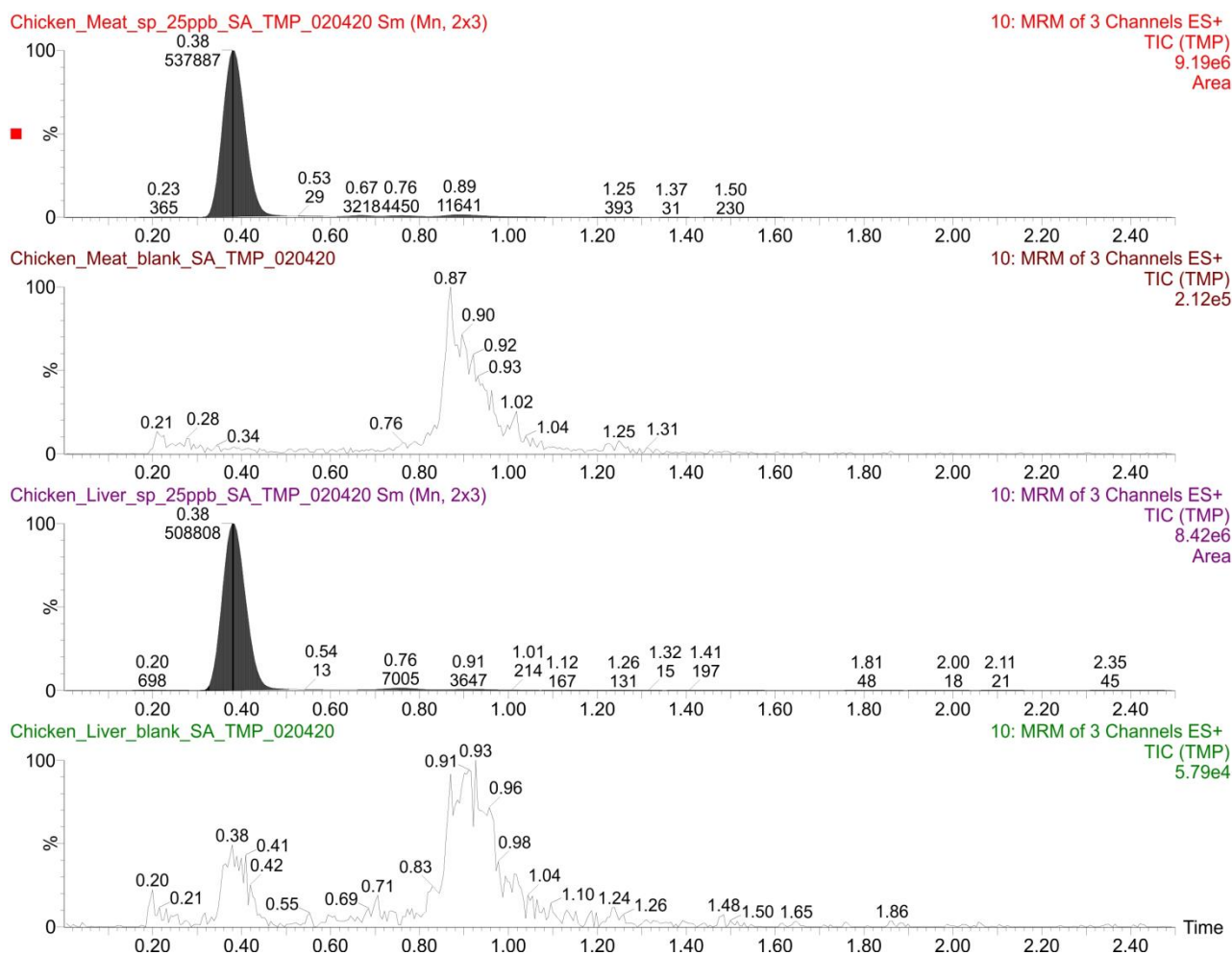


Рис. 4. Хроматограми екстрактів контрольних м'язів та печінки курчат, а також відповідних зразків, навантажених триметопримом на рівні 25 мкг/кг

Compound name: TMP
 Correlation coefficient: $r = 0.998852$, $r^2 = 0.997706$
 Calibration curve: $172710 \cdot x + -5147.43$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

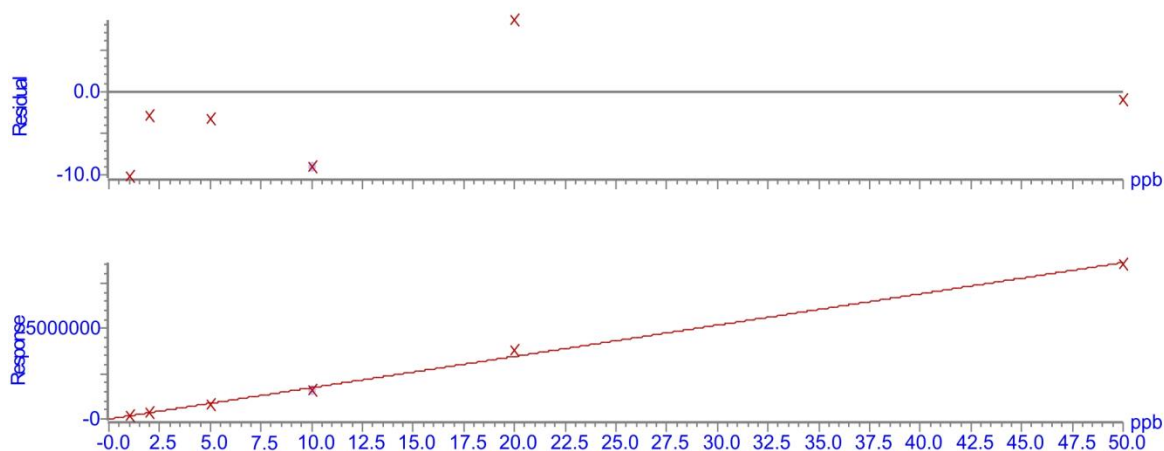


Рис. 5. Калібрувальний графік для визначення залишків триметоприму в діапазоні 0 – 50 мкг/кг в зразках м'язових тканин курчат, побудований на матриці (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9977$).

Compound name: TMP
 Correlation coefficient: $r = 0.999306$, $r^2 = 0.998613$
 Calibration curve: $22275.7 \cdot x + 5652.05$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

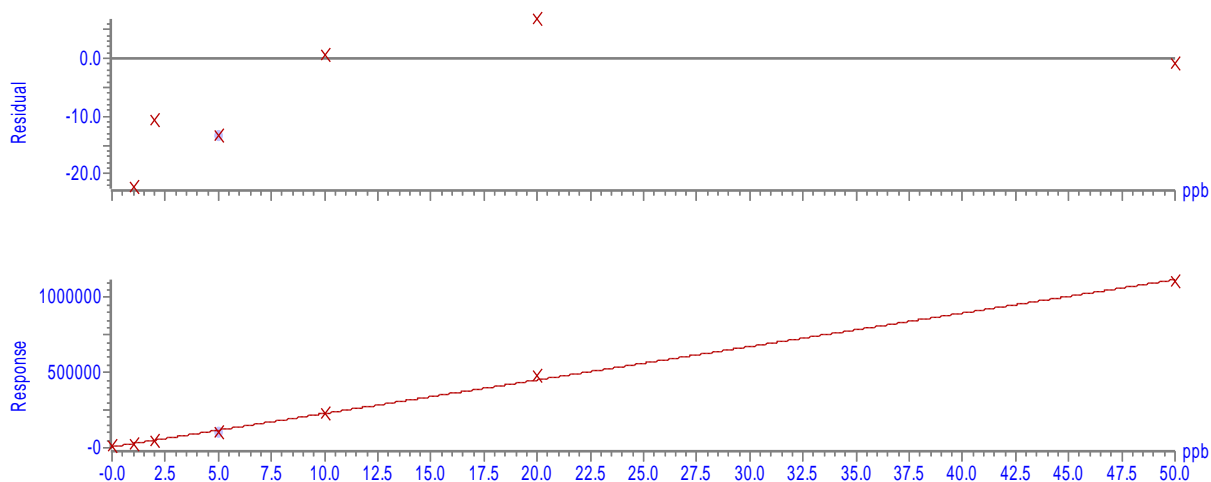


Рис. 6. Калібрувальний графік для визначення залишків триметоприму в діапазоні 0 – 50 мкг/кг в зразках м'язових печінки курчат, побудований на матриці (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9986$).

Результати порівняльних досліджень контрольних та навантажених зразків м'язів і печінки представлено в таблиці 6.

Як видно з даних таблиці 6, значення, отримані для навантажених зразків м'язових тканин та печінки на рівні 25,0 мкг/кг, є вищими за значення, отримані за дослідження методом ІФА. Так, результати отримані за дослідження імуноферментним аналізом становили 21,34 мкг/кг для м'язової тканини з витягом 76,1 %, то за дослідження методом УЕРХ-МС/МС – 24,87 мкг/кг та 99,5 %, відповідно. Для зразків печінки результат для методу ІФА становив 21,7 мкг/кг за витягу 79 %, то для методу УЕРХ МС/МС – 23,2 мкг/кг за витягу 93 %.

Порівняння результатів визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках м'язових тканин курчат-бройлерів методами УЕРХ-МС/МС та ІФА

Зразки	Навантаження зразка, мкг/кг	Встановлено аналіту, мкг/кг			
		Метод УЕРХ-МС/МС	R, %	ІФА	R, %
М'язова тканина	0	0,04 ± 0,01	-	2,3 ± 0,3	-
М'язова тканина	25	24,87 ± 0,25	99,5	21,34 ± 0,95	76,1
Печінка	0	0,07 ± 0,03	-	1,97 ± 0,11	-
Печінка	25	23,15 ± 0,95	92,6	21,71 ± 2,1	79

Значення матричного впливу для зразків, досліджуваних методом УЕРХ-МС/МС складають слідові кількості: 0,04 і 0,07 мкг/кг, для зразків м'язових тканин та печінки, відповідно, оскільки калібрувальні криві (рис. 5 та 6) для розрахунку вмісту триметоприму у зразках будують на чистих (контрольних) зразках відповідних матриць.

Таким чином, розроблений спосіб підготовки зразків м'язових та паренхіматозних тканин для проведення подальшого скринінг-дослідження на вміст залишкових кількостей триметоприму методом імуноферментного аналізу тест-наборами Trimethoprim фірми Kwinbon Biotechnology (Китай) придатний для контролю сировини тваринного походження виробничими та контрольними лабораторіями, що додатково підтверджено шляхом верифікації методики за використання підтверджуючого УЕРХ-МС/МС методу.

В И С Н О В К И

Розроблена методика пробопідготовки для імуноферментного визначення залишкових кількостей триметоприму у зразках м'язових та паренхіматозних тканин курчат на рівні 5 мкг/кг чутлива, експресна і точна, та дозволяє використовувати з цією метою набір для ІФА, розроблений під іншу цільову матрицю (мед). Методика була запропонована виробникові тест-набору для затвердження, оскільки вона цілком відповідає вимогам Директиви ЄС 2002/657/ЕС.

Перспективи досліджень. Розроблена методика підготовки зразків м'яса та печінки курчат для визначення залишкових кількостей триметоприму дозволить виробничим, контрольним та науковим лабораторіям проводити дослідження безпеки цієї продукції на рівні, передбаченому Планом державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і неперероблених харчових продуктах тваринного походження згідно Наказу № 2646 Міністерства охорони здоров'я України з питань Показників безпечності харчових продуктів від 23.12.2019.

References

Abd Elkhabeer, M., Ramadan, G.A., Ryad Eglal, L., Souaya, R. (2020). Analytical Method Optimization and Determination of Sulfonamides, Chloramphenicol and Tetracyclines Drug Residues in Chicken Meat across Egypt. *Journal of Food Processing & Technology*. 11(4) DOI: 10.35248/2157-7110.20.11.825

Amini, H. & Ahmadiani, A. (2007). Rapid and simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 43(3). 1146-1150 DOI.org/10.1016/j.jpba.2006.09.004

Andrée, S. & Schwägele, F. (2007). Determination of veterinary drug residues in poultry meat – Sulfonamides and trimethoprim. *Fleischwirtschaft –Frankfurt*. 87(6). 104-108.

Baert, K., De Baere, S., Croubels, S., De Backer, P. (2003). Pharmacokinetics and oral bioavailability of sulfadiazine and trimethoprim in broiler chickens. *Veterinary Research Communications*. 27(4), 301-309. DOI: 10.1023/a:1024084108803

Biswas, A.K., Rao, G.S., Kondaiah, N., Anjaneyulu, A.S.R., Malik, J.K. (2007). Simple Multiresidue Method for Monitoring of Trimethoprim and Sulfonamide Residues in Buffalo Meat by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55(22), 8845-8850. DOI: org/10.1021/jf071140w

Bousova, K., & Mittendorf, K. (2016). Automated Online Multi-Residue LC-MS/MS Method for the Determination of Antibiotics in Chicken Meat. Method number: 63646. Thermo Fisher Scientific.

Brands, E., Kubalec, P., Machác, L. (1997). HPLC determination of trimethoprim in meat and milk with an SPE preseparation procedure. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*. 204. 341-344.

CODEX ALIMENTARIUS (2012). Maximum residue limits for veterinary drugs in foods updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission, CAC/LMR 2.

De Baere, S., Baert, K., Croubels, S., De Busser, J., De Wasch, K., De Backer, P. (2000). Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analyst*. 125. 409-415. DOI: 10.1039/a908750h

European Commission (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 14 August 2002 on implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 2002/657/EC. *Official Journal of European Community*. L. 221. 8-36.

European Council (2010). Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Union*. L15. 1-72.

Hui, Li, Hanwen, S., Jingxuan, Zh., Kun, P. (2013). Highly sensitive and simultaneous determination of sixteen sulphonamide antibiotics, four acetyled metabolites and trimethoprim in meat by rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Control*. 31(2). 359-365.

Mohamed, D. & Fouad, M.M. (2020). Application of NEMI, Analytical Eco-Scale and GAPI tools for greenness assessment of three developed chromatographic methods for quantification of sulfadiazine and trimethoprim in bovine meat and chicken muscles: Comparison to greenness profile of reported HPLC methods. *Microchemical Journal*. 157. 104873

Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K., Spiteller, M. (2002). Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 6(7). 663-669. DOI: 10.1002/rcm.624.

Pikkemaat, M.G., Rapallini, M.L.B.A., Zuidema, T., Elferink, J.W.A., Oostra-van Dijk, S., Driessen-van Lankveld, W.D.M. (2011). Screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals: comparison of the EU-four plate method, the Nouws Antibiotic Test and the Premi®Tedt (applied to muscle and kidney). *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 28(1). 26-34. DOI: 10.1080/19440049.2010.535027.

Sayar, E., Sahin, S., Cevheroglu, S., Atilla Hincal, A. (2010). Development and validation of an HPLC method for simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in human plasma. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 35. 41-46.

Soto-Chinchilla, J.J, García-Campaña, A.M, Gamiz-Gracia, L. (2007). Analytical methods for multiresidue determination of sulfonamides and trimethoprim in meat and ground water samples by CE-MS and CE-MS/MS. *Electrophoresis*. 28(22). 4164-4172. DOI: 10.1002/elps.200600848.

Varenina, I., Bilandzic, N., Kolanovic, B.S., Bozic, D., Sedak, M., Dokic, M. (2016). Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. 33(4). 656-667. DOI.org/10.1080/19440049.2016.1152569

Wang, S., Zhang, H.Y., Wang, L., Duan, Z.J., Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *Food Additives & Contaminants*. 23(4), 362-384.

Yanovych, D., Zasadna, Z., Rydchuk, M., Plotycya, S., Kislova, S., Pazderska, O. (2020). The development of the method for determination of sulfonamides and trimethoprim residual quantities in milk samples by UPLC-MS/MS method and its verification through interlaboratory testing. 21(2) 170-182. DOI: 10.36359/scivp.2020-21-2.23.