ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСИЦИКЛІНУ У ЗРАЗКАХ ТКАНИН І ПЛАЗМИ КРОВІ ТВАРИН З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДІВ СКРИНІНГУ ТА ПІДТВЕРДЖЕННЯ

Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. І. Плотиця, канд. хім. наук,
С. М. Кіслова, старший науковий співробітник,
О. М. Паздерська, старший науковий співробітник
С. Р. Івах, старший лаборант з в/о

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 валідації методики підготовки зразків м'язових та паренхіматозних тканин тварин для проведення подальшого дослідження на вміст залишкових кількостей доксицикліну методом імуноферментного аналізу тест-наборами *Oxytetracycline ELISA* фірми EuroProxima (Нідерланди), призначеного для аналізу іншої цільової матриці, а саме – меду та креветок. Приведено результати модифікації способу підготовки зразків креветок для проведення аналізу зразків м'язових та паренхіматозних тканин. Згідно з Рішенням Європейської Комісії 2002/657/ЕС, проведено валідацію запропонованої методики з урахуванням максимально допустимих рівнів (МДР) доксицикліну в тканинах продуктивних тварин: 100 мкг/кг – для м'язових тканин та 300 мкг/кг – для печінки. 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 доксицикліну на рівні $\frac{1}{2}$ МДР зразків м'язових та паренхіматозних тканин курчат-бройлерів за критерієм «додано-одержано». Встановлено, що такий підхід до підготовки зразків дає змогу визначити залишки доксицикліну в тканинах птиці на рівні 5-10 мкг/кг з абсолютним виходом близько 54 %.

Основними перевагами розробленої методики є простота виконання, експресність та економічна ефективність. Достовірність отриманих скринінг-методом результатів доведено використанням підтверджуючого УЕРХ-МС/МС методу, а саме: проведено порівняльне дослідження чистих та навантажених зразків м'язових та паренхіматозних тканин курчат-бройлерів. Представлено спосіб підготовки досліджуваних зразків, умови проведення аналізу, основні валідаційні характеристики підтверджуючого методу. За отриманими результатами зроблено висновок про придатність розробленого скринінг-методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей доксицикліну у зразках м'язових та паренхіматозних тканин та можливість його використання для рутинних лабораторних досліджень, а також для встановлення періодів виведення залишків ветеринарних лікарських засобів на основі доксицикліну з тканин продуктивних тварин. Також на основі використання цього ж тест-набору було запропоновано методику підготовки зразків плазми крові птиці для визначення вмісту доксицикліну (на рівні мкг/мл) з метою вивчення біоеквівалентності ветеринарних препаратів, які містять доксициклін як

активний фармацевтичний інгредієнт, що також було підтверджено методом УЕРХ-МС/МС.

Ключові слова: ДОКСИЦИКЛІН, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, ТКАНИНИ, ПЛАЗМА КРОВІ, ІФА, УЕРХ-МС/МС, ВАЛІДАЦІЯ.

DOXYCYCLINE DETERMINATION IN ANIMAL TISSUES AND BLOOD PLASMA SAMPLES USING SCREENING AND CONFIRMATORY METHODS

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

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 validation of sample preparation method for muscle and parenchymal tissues of animals for further determination of doxycycline residual amounts by enzyme-linked immunosorbent assay using Oxytetracycline ELISA test kits from EuroProxima (Netherlands), initially developed for the analysis of other target matrices, viz. honey and shrimp. The results of modification of shrimp sample preparation method for the analysis of muscle and parenchymal tissue samples are showed. In accordance with the European Commission Decision 2002/657/EC, the proposed method was validated taking into account the maximum residue levels (MRLs) of doxycycline in tissues of productive animals: 100 µg/kg for muscle tissue and 300 µg/kg for liver. The suitability of the technique was confirmed on the basis of the established main validation parameters for screening methods (technical threshold and cut-off factor) using control (pure) and spiked with standard doxycycline solution at the level of ½MRL samples of muscle and parenchymal tissues of broiler chickens by means of “added – found” criterion. It was discovered that this approach to sample preparation makes it possible to determine doxycycline residues in poultry tissues at the level of 5-10 µg/kg with the absolute recovery about 54 %. The main advantages of the developed technique are simplicity of performance, rapidity and cost-effectiveness.

The reliability of the results obtained by the screening method was verified using confirmatory UPLC-MS/MS method, viz. a comparative study of blank and spiked samples of muscle and parenchymal tissues of broiler chickens. The method of sample preparation of the studied specimens, the conditions of analysis carrying out, and the main validation parameters of the confirmatory method are also presented. Based on the obtained results, it was concluded that the developed screening method of enzyme-linked immunosorbent assay is suitable for the determination of doxycycline residual amounts in muscle and parenchymal tissues samples, and it is possible to use it for routine laboratory tests, as well as for the establishment of withdrawal periods of veterinary drugs based on doxycycline from the tissues of productive animals. Also using the same test kit, the sample preparation method for blood plasma samples for doxycycline content assay (at the levels of µg/ml) was suggested to study the bioequivalence of veterinary drugs containing doxycycline as an active pharmaceutical ingredient, which was as well confirmed by UPLC-MS/MS.

Keywords: DOXYCYCLINE, RESIDUES, TISSUES, BLOOD PLASMA, ELISA, UPLC-MS/MS, VALIDATION

Доксициклін (5-гідрокси- α -6-деокситетрациклін) – це напівсинтетичний антибіотик тетрациклінового ряду другого покоління, отриманий шляхом модифікації молекули окситетрацикліну (рис. 1).

Рис. 1. Хімічна структура доксицикліну

Доксициклін проявляє свою антимікробну активність, головним чином, зв'язуючись з 30S рибосомною субодиницею бактерій, блокуючи синтез білка (Nguyen et al., 2014). У порівнянні з іншими антибіотиками тетрациклінового ряду, доксициклін у 5-10 разів більш ліпофільний, що сприяє його ефективнішому проникненню у тканини, відповідно покращуючи його розподіл в організмі і тим самим підвищуючи його протимікробні властивості. Крім того, доксициклін краще зв'язується з білками плазми крові, що значно збільшує період піввиведення (Yang et al., 2016). Цей антибіотик володіє широким спектром дії проти найрізноманітніших мікроорганізмів, зокрема, аеробних та анаеробних грампозитивних та грамнегативних бактерій, хламідій, рикетсій та мікоплазми. Його успішно використовують у гуманній медицині понад 40 років для лікування хвороб органів дихання, шкіри, м'яких тканинах та сечостатевої системи (Aronson, 1980; Riond et al., 1989; Axisa et al., 2000). У ветеринарній медицині доксициклін використовується для лікування захворювань дихальних шляхів у собак, пневмонії у великої рогатої худоби та свиней, колібактеріозу та пситтакозу у птиці (Riond et al., 1989; Meijer et al., 1993; Santos et al., 1996; Davis et al., 2006; Luis et al. 2009; Hosnia et al. 2015; Das et al., 2019).

Для визначення залишкових кількостей доксицикліну у продуктах харчування та плазмі крові використовують метод імуноферментного аналізу, тонкошарову хроматографію, мікробіологічний метод та методи підтвердження: РХ-МС/МС, ВЕРХ-УФ/ФЛД, ГХ-МС/МС (Axisa et al., 2000; Gaida et al., 2008; Gaida et al., 2014; Kogawa & Salgado, 2012; Tekeli et al., 2020).

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

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

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 μ m, 50 mm $\times$ 2.1 mm) із передколонукою ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (1.7 μ m, 5 mm $\times$ 2.1 mm) фірми Waters (США).

Приготування зразків для дослідження скринінг-методом. 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 місять цільовий аналіт, та не виявлено залишкових кількостей доксицикліну у попередньо проведених дослідженнях. Зразки очищали від сполучних тканин та ретельно подрібнювали гомогенізатором впродовж 3 хв. Імуноферментний аналіз проводили на тест-наборах Oxytetracycline ELISA 50910TC EuroProxima (Нідерланди), призначеного для визначення залишкових кількостей доксицикліну у зразках меду та креветок. Пробопідготовка плазми крові полягала у послідовному розведенні відповідним буферним розчином до отримання тих концентрацій аналіту, які потрапляли в середній діапазон концентрацій калібрувальної кривої тест-набору.

Приготування зразків для дослідження підтверджуючим методом VEPX-MC/MC.

М'язові та паренхіматозні тканини. У поліпропіленову пробірку для центрифугування об'ємом 50 мл зважують 2 г гомогенізованого зразка, додають 10 мл фосфатно-цитратного буферного розчину рН 4 та 4 мл ацетонітрилу, струшують 10 с на вортексі. Екстракцію аналіту проводять в ультразвуковій бані за кімнатної температури впродовж 15 хв, додають 12 мл етилацетату, струшують на роторному шейкері за швидкості 60 грм впродовж 15 хв та розділяють фази центрифугуванням впродовж 10 хв за швидкості 4700 грм і температури 4 °С. Концентрування аліквоти екстракту до сухого залишку проводять за температури 40 °С у роторному випарювачі. Сухий залишок відновлюють у 500 мкл 0,1 % розчину формиатної кислоти в 30 % метанолі і струшують на вортексі впродовж 20 с. Знежирюють 1,5 мл суміші гексану з тетрахлорметаном (1:1) і струшують на вортексі впродовж 20 с. Зразки кількісно переносять у мікропробірки типу «епендорф» і центрифугують впродовж 5 хв за 21000 g і температури 4 °С. Для хроматографічного аналізу використовують приблизно 200 мкл верхньої фракції. Фактор концентрування – 2.

Плазма крові. У поліпропіленову пробірку для центрифугування об'ємом 15 мл вносять 100 мкл плазми крові, додають 2 мл фосфатно-цитратного буферного розчину рН 4 та 1 мл ацетонітрилу, струшують 10 с на вортексі. Екстракцію аналіту проводять в ультразвуковій бані за кімнатної температури впродовж 15 хв, додають 5 мл етилацетату, струшують на роторному шейкері за швидкості 60 грм впродовж 15 хв та розділяють фази центрифугуванням впродовж 10 хв за швидкості 4700 грм і температури 4 °С. Концентрування аліквоти екстракту до сухого залишку проводять за температури 40 °С у роторному випарювачі. Сухий залишок відновлюють у 800 мкл 0,1 % розчину формиатної кислоти в 30 % метанолі і струшують на вортексі впродовж 20 с. Фактор розведення – 10. Знежирюють 0,5 мл суміші гексану з тетрахлорметаном (1:1) і струшують на вортексі впродовж 20 с. Зразки кількісно переносять у мікропробірки типу «епендорф» і центрифугують впродовж 5 хв за 21000 g і температури 4 °С. Відбирають приблизно 200 мкл верхньої фракції, послідовно розводять мобільною фазою до отримання цільових концентрацій доксицикліну, і переносять у віали для хроматографічного аналізу.

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 – 0,4 мл/хв. Об'єм інжекції – 10 мкл. Температура колонки – 40 °С. Час розділення – 6,0 хв. Час виходу доксицикліну – 1,98 хв.

Розділення проводили за градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0:00	90	10
0:30	90	10
1:35	10	90
2:60	10	90
2:80	90	10
6:00	90	10

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.

Таблиця 1

Параметри сканування мас доксицикліну тандем-мас-спектрометричним детектором

Прекурсор-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Продукт-іон, m/z	Енергія зіткнення (Collision Energy), V
445,3	36	154,0	28
		339,2	25
		410,2	23
		428,2	16

Визначення вмісту доксицикліну 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. За інструкцією виробника, тест-набір Oxytetracycline ELISA 50910TC EuroProxima (Нідерланди) розрахований на визначення залишкових кількостей аналіту лише у зразках меду та креветках. Для встановлення каренції препаратів на основі доксицикліну, нами проведено випробування способу підготовки зразків креветок, запропонованого виробником тест-набору, для визначення вмісту цього аналіту у зразках м'язових тканин та паренхіматозних органів курчат-бройлерів.

Для оцінки придатності методики використовували зразки м'язових тканин та печінки курчат-бройлерів контрольної групи, яких утримували окремо від дослідних груп птиці. Відібрані зразки попередньо досліджували методом УЕРХ-МС/МС на вміст доксицикліну. Збагачення зразків до рівня цільової концентрації скринінгу проводилось з використанням стандарт-розчину доксицикліну (Doxycycline hyclate, Sigma-Aldrich, CAS 24390-14-5, 99,3 %). Для експериментального дослідження придатності методики встановлюють величину цільової концентрації скринінгу (концентрацію, при якій скринінг-метод класифікує зразок як

скринінг-позитивний). Для зареєстрованих препаратів вона становить на рівні або нижче МДР (якщо дозволяє метод – то на рівні $\frac{1}{2}$ МДР). У даному випадку МДР становить 100 мкг/кг для зразків м'язової тканини та 300 мкг/кг – для печінки курчат, тому відповідно навантаження зразків проводилось на рівні $\frac{1}{2}$ МДР – 50 мкг/кг для зразків м'язових тканин та 150 мкг/кг – для печінки. Метрологічні характеристики тест-набору дозволяють проводити дослідження вказаного аналіту на рівні від 2 мкг/кг для зразків креветок.

Встановлення відсотку витягу аналіту (R, %) із зразків печінки та м'язів курчат-бройлерів проводилось за критерієм «додано–одержано». Гомогенізовані зразки тканин контрольних тварин були збагачені додаванням стандартного розчину доксицикліну на попередньо визначеному рівні: 50 мкг/кг та 150 мкг/кг, відповідно для м'язових та паренхіматозних тканин. Зразки тканин ретельно гомогенізували та зважували у поліпропіленові пробірки об'ємом 15 мл. Екстрагування аналіту проводили приготуванням буфером МакІлвейна рН 7 впродовж 10 хв при постійному перемішування на орбітальному шейкері. Фази розділяли центрифугуванням. Аліквоту супернатанту відбирали у чисту пробірку і змішували з буфером для розведення зразків, що надається у наборі.

Результати оцінки придатності методики визначення залишків доксицикліну у м'язах, наведено у таблиці 2. Одержані результати підтверджують придатність методики для визначення вмісту залишків доксицикліну у м'язовій тканині курчат-бройлерів на рівні МДР з вірогідністю одержаних даних на рівні 95 %.

Таблиця 2

**Результати оцінки придатності методики визначення доксицикліну
в зразках м'язових тканин курчат-бройлерів, (n = 20)**

Контрольні зразки				Зразки збагачені доксицикліном (50 мкг/кг)				
№	OD	B/B0(%)	Conc	№	OD	B/B0(%)	Conc	R, %
1	0,435	26,3	12,01	1	0,191	11,5	27,04	54,24
2	0,327	19,8	15,77	2	0,202	12,2	25,21	50,46
3	0,335	20,2	15,42	3	0,196	11,8	26,15	52,22
4	0,386	23,3	13,50	4	0,187	11,3	27,83	55,82
5	0,431	26,0	12,13	5	0,196	11,8	26,15	52,42
6	0,407	24,6	12,83	6	0,195	11,8	26,32	52,62
7	0,350	21,1	14,80	7	0,188	11,4	27,62	55,30
8	0,338	20,4	15,29	8	0,177	10,7	30,23	60,42
9	0,318	19,2	16,18	9	0,191	11,5	27,04	54,24
10	0,424	25,6	12,32	10	0,197	11,9	25,98	51,74
11	0,336	20,3	15,38	11	0,196	11,8	26,15	52,24
12	0,386	23,3	13,50	12	0,196	11,8	25,16	52,24
13	0,366	22,1	14,20	13	0,183	11,1	28,17	57,30
14	0,407	24,6	12,83	14	0,181	10,9	29,18	58,42
15	0,437	26,4	11,96	15	0,195	11,8	26,32	52,44
16	0,416	25,1	12,56	16	0,176	10,6	30,51	60,70
17	0,353	21,3	14,69	17	0,191	11,5	27,04	54,24
18	0,345	20,8	15,00	18	0,182	11,0	28,94	57,78
19	0,368	22,2	14,12	19	0,177	10,7	30,23	60,50
20	0,386	23,3	13,50	20	0,195	11,8	26,32	52,46
M	0,38	22,81	13,91	M	0,19	11,46	27,45	54,89
SD	0,04	2,37	1,37	SD	0,01	0,47	1,62	3,23
M+SD*2,33	0,47	28,32	17,11	M+SD*1,64	0,18	10,68	24,79	49,59
M-SD*2,33	0,29	17,30	10,72	M-SD*1,64	0,20	12,23	30,10	60,19
CV%	10,37	10,37	9,85	CV%	4,11	4,11	5,89	22,60

Одержані результати оцінки придатності методики визначення залишкових кількостей доксицикліну у печінці наведено у таблиці 3. Обчислений відсоток витягу залишків доксицикліну із зразків м'язової тканини і печінки становив: 54,89 % та 53,98 %, відповідно, що було використано для розрахунку даних, одержаних у кінетичному експерименті.

Встановлено технічний поріг методики для виявлення (LOD) залишків доксицикліну у м'язовій тканині та печінці ($M+SD*2,33$) на рівні: 17,11 мкг/кг та 19,59 мкг/кг, відповідно. Середні значення вмісту залишків доксицикліну у зразках м'язової тканини та печінки, збагачених аналітом на рівні 50 та 150 мкг/кг, становили 27,45 мкг/кг та 80,98 мкг/кг, відповідно.

Таблиця 3

Результати оцінки придатності методики визначення залишків доксицикліну в зразках печінки курчат-бройлерів, (n = 20)

Контрольні зразки				Зразки збагачені доксицикліном (50 мкг/кг)				
№	OD	B/B0(%)	Conc	№	OD	B/B0(%)	Conc	R, %
1	0,282	17,04	18,03	1	0,068	4,109	78,01	52,01
2	0,327	19,76	15,77	2	0,071	4,290	76,78	51,19
3	0,342	20,66	15,13	3	0,062	3,746	80,48	53,65
4	0,276	16,68	18,50	4	0,066	3,988	78,83	52,55
5	0,368	22,24	14,13	5	0,066	3,988	78,83	52,55
6	0,325	19,64	15,82	6	0,044	2,659	87,95	58,63
7	0,305	18,43	16,85	7	0,065	3,927	79,12	52,75
8	0,339	20,48	15,33	8	0,051	3,082	85,03	56,69
9	0,317	19,15	16,21	9	0,048	2,900	86,28	57,52
10	0,295	17,83	17,34	10	0,053	3,202	84,2	56,13
11	0,335	20,24	15,41	11	0,061	3,686	80,89	53,93
12	0,291	17,58	17,55	12	0,053	3,202	84,12	56,08
13	0,279	16,86	18,21	13	0,046	2,779	87,12	58,08
14	0,286	17,28	17,85	14	0,067	4,048	78,42	52,28
15	0,347	20,97	14,95	15	0,065	3,927	79,24	52,83
16	0,332	20,06	15,56	16	0,051	3,082	85,03	56,69
17	0,309	18,67	16,65	17	0,059	3,565	81,72	54,48
18	0,345	20,85	15,01	18	0,077	4,653	74,32	49,55
19	0,281	16,98	18,11	19	0,068	4,109	78,01	52,01
20	0,291	17,58	17,56	20	0,075	4,532	75,14	50,09
M	0,31	18,95	16,50	M	0,06	3,67	80,98	53,98
SD	0,03	1,67	1,33	SD	0,01	0,59	4,00	2,67
M+SD*2,33	0,38	22,84	19,59	M+SD*1,64	0,04	2,71	74,41	49,61
M-SD*2,33	0,25	15,06	13,41	M-SD*1,64	0,08	4,63	87,54	58,36
CV%	8,82	8,82	8,04	CV%	15,93	15,93	4,94	68,97

Оцінку отриманих при валідації даних проводять з врахуванням 5 % похибки β та визначенні рівня відсікання за допомогою графічного подання здатності виявлення ССВ. Для кожного результату серії досліджень чистих (контрольних) зразків визначають значення сигналу відповіді B1 аналітичних реакцій, обчислюють середнє значення відповіді для серії чистих зразків B та стандартне відхилення SDb їх відповіді. В подальшому обчислюють граничне значення або «технічний поріг» T:

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

де: B –м середнє значення відповіді;

SDb – стандартне відхилення значень порожніх зразків.

Для кожного результату серії досліджень збагачених зразків визначають значення сигналу відповіді Y1 аналітичних реакцій. Для серії збагачених зразків обраховують середнє значення відповіді M та стандартне відхилення SD їх відповіді. Для методу ІФА відповідь B/B0% (відсоток відношення оптичного поглинання одержаного значення до стандартного зразка з нульовою концентрацією аналіту) обернено-пропорційно до одержаної концентрації. Тому:

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

де: M – середнє значення відповіді;
SD – стандартне відхилення значень збагачених зразків.

Рис. 2. Графічне зображення технічного порогу та фактору відсікання для зразків м'язових тканин курчат.

Рис. 3. Графічне зображення технічного порогу та фактору відсікання для зразків печінки курчат.

Як видно з рис. 2 та рис. 3, між середнім значенням відповіді холостих зразків В та технічним порогом рівень помилково-позитивних результатів скринінгу більший за 5%. Відповідно до рішення ЄС 2002/657 здатність виявлення методики відповідає критеріям коли $(CC\beta) > V$.

Отже, розроблена методика визначення залишкових кількостей доксицикліну у зразках м'язових та паренхіматозних тканин за чутливістю відповідає вимогам встановлених максимально допустимих рівнів та відсотку витягу, що повністю відповідає вимогам до скринінг-методів. Представлені результати валідації підтверджують придатність методики для рутинного аналізу продуктів тваринного походження та можливість її використання 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 доксицикліном 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 доксицикліну в тканинах м'язів та паренхіматозних органів наведено в таблиці 4.

Таблиця 4

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

Зразки	Межа детектування LOD, мкг/кг	Межа визначення LOQ, мкг/кг	Межа прийняття рішення CC α , мкг/кг	Здатність виявлення CC β , мкг/кг
М'ясо	0,5	1,5	104,4	110,7
Печінка	2,0	4,5	306,2	324,9

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

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

Compound name: Doxycycline
 Correlation coefficient: $r = 0.999534$, $r^2 = 0.999068$
 Calibration curve: $30891.9 \cdot x + -23066.1$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

Рис. 5. Калібрувальний графік для визначення залишків доксицикліну в діапазоні 0 – 50 мкг/кг в зразках м'язових тканин курчат, побудований на матриці (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0.9990$).

Compound name: Doxycycline
 Correlation coefficient: $r = 0.998772$, $r^2 = 0.997546$
 Calibration curve: $3806.52 \cdot x + 8659.09$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

Рис. 6. Калібрувальний графік для визначення залишків доксицикліну в діапазоні 0 – 50 мкг/кг в зразках м'язових печінки курчат, побудований на матриці (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0.9975$).

Результати порівняльних досліджень контрольних та навантажених зразків м'язів і печінки представлено в таблиці 5.

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

Зразки	Навантаження зразка, мкг/кг	Встановлено вміст аналіту, мкг/кг			
		Метод УЕРХ-МС/МС	R, %	ІФА	R, %
М'язова тканина	0	0,05 ± 0,01	-	13,9 ± 1,4	-
М'язова тканина	25,0	24,5 ± 0,7	98,0	23,2 ± 1,6	54,8
Печінка	0	0,12 ± 0,05	-	16,5 ± 1,3	-
Печінка	25,0	23,1 ± 0,8	92,4	22,6 ± 2,4	54,0

Як видно з даних таблиці 5, значення, отримані методом підтвердження для навантажених зразків м'язових тканин та печінки на рівні 25,0 мкг/кг, є вищими за значення, отримані з врахуванням відсотку витягу за дослідження методом ІФА. Так, результати отримані імуноферментним аналізом становили 23,2 мкг/кг для м'язової тканини з витягом 54,8 %, то за дослідження методом УЕРХ-МС/МС – 24,5 мкг/кг та 98,0 %, відповідно. Для зразків печінки результат для методу ІФА становив 22,6 мкг/кг за витягу 54,0 %, то для методу УЕРХ МС/МС – 23,1 мкг/кг за витягу 92,4 %. Значення матричного впливу для зразків, досліджуваних методом УЕРХ-МС/МС складають слідові кількості: 0,05 і 0,12 мкг/кг для зразків м'язових тканин та печінки, відповідно, оскільки калібрувальні криві (рис. 5 та рис. 6) для розрахунку вмісту доксицикліну у зразках будують на чистих (контрольних) зразках відповідних матриць, і зважаючи на дуже високу селективність методу підтвердження за рахунок особливостей тандем-мас-спектрометричного детектора.

Таким чином, розроблений спосіб підготовки зразків м'язових та паренхіматозних тканин для проведення подальшого скринінг-дослідження на вміст залишкових кількостей доксицикліну методом імуноферментного аналізу тест-наборами Oxytetracycline ELISA 50910ТС EuroProxima (Нідерланди), розрахований на визначення залишкових кількостей аналіту лише у зразках меду та креветках, придатний для контролю сировини тваринного походження виробничими та контрольними лабораторіями, що додатково підтверджено, шляхом верифікації методики за використання підтверджуючого УЕРХ-МС/МС методу.

Також ми перевірили можливість використання тест-набору Oxytetracycline ELISA 50910ТС EuroProxima для вивчення біоеквівалентності ветеринарних препаратів, які містять доксициклін як активний фармацевтичний інгредієнт, а саме: для визначення доксицикліну на концентраційному рівні мкг/мл в плазмі крові курчат-бройлерів. Виробник рекомендує застосовувати цей набір для визначення залишкових кількостей доксицикліну (діапазон концентрацій від 0,14 до 4,0 нг/мл, з врахуванням відсотку витягу для досліджуваного аналіту), але нами було проведено дослідження з використанням навантажених доксицикліном зразків контрольної плазми курей, за результатами якого було запропоновано адаптований спосіб підготовки зразків плазми (а потенційно – й інших біологічних рідин), що містять високий вміст цього антибіотика. Для вивчення брали чисту плазму курей (попередньо перевірену методом УЕРХ-МС/МС на вміст доксицикліну), збагачували стандартним розчином доксицикліну на рівні 1 і 5 мкг/мл, і послідовно розводили в 5000 разів буфером для розведення зразків, що надається у наборі, для того, щоб отримані розчини, які за вмістом аналіту потрапляли в концентраційний інтервал калібрувальної кривої, і далі проводили аналіз імуноферментним методом згідно з інструкцією. Для навантаження обрали такі концентрації доксицикліну, порядок яких близький до вмісту його в плазмі крові курей-бройлерів при лікуванні їх препаратами на основі доксицикліну (Anadon et al., 1994; Laczay et al., 2001; Wijayanti et al., 2011; Hsiao et al., 2016; Pai-Feng et al., 2016; Yang et al., 2018). Для перевірки правильності та ефективності такого підходу, ці ж зразки було проаналізовано методом УЕРХ-МС/МС, використовуючи калібрувальний графік в інтервалі 0 – 10,0 мкг/мл, побудований на матриці чистого зразка плазми крові курчат-бройлерів. На рис. 7 наведено хроматограми

підготованих і відповідно розведених екстрактів чистої плазми крові курчат та навантажених доксицикліном на рівні 1 і 5 мкг/мл, а на рис. 8 – калібрувальний графік на контрольній матриці.

Рис. 7. Хроматограми розведених екстрактів чистої (контрольної) плазми крові курчат і навантаженої доксицикліном на рівні 1 та 5 мкг/мл.

Compound name: Doxycycline
 Correlation coefficient: $r = 0.997267$, $r^2 = 0.994541$
 Calibration curve: $24798.3 \cdot x + 2894.7$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

Рис. 8. Калібрувальний графік для визначення доксицикліну в діапазоні 0 – 10 мкг/мл в зразках плазми крові курчат-бройлерів, побудований на матриці (коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9945$).

Результати порівняльних досліджень контрольних та навантажених зразків плазми крові курчат-бройлерів представлено в таблиці 6.

Таблиця 6

Порівняння результатів визначення доксицикліну у зразках плазми крові курчат-бройлерів методами УЕРХ-МС/МС та ІФА

Навантаження зразка, мкг/мл	Визначено доксицикліну, мкг/мл			
	Метод УЕРХ-МС/МС	R, %	ІФА	R, %
0	0,021 ± 0,006	-	0,79 ± 0,02	-
1,0	1,08 ± 0,13	108,0	1,7 ± 0,15	52,9
5,0	4,63 ± 0,50	94,6	5,7 ± 0,22	53,2

Згідно з результатами, значення, отримані методом УЕРХ-МС/МС для навантажених доксицикліном зразків плазми крові курей на рівні 1,0 та 5,0 мкг/мл (з врахуванням відповідного розведення мобільною фазою), є дещо нижчими, ніж ті, що отримані за допомогою імуноферментного аналізу з використанням адаптації пробопідготовки плазми до зразків з високим вмістом доксицикліну. Як і у випадку порівняльного аналізу тканин, це можна пояснити високою селективністю тандем-масспектрометричного детектора. Отже, цей підхід дає змогу застосовувати тест-набір Oxytetracycline ELISA 50910TC EuroProxima (Нідерланди) для визначення вмісту доксицикліну у плазмі крові та для забезпечення на належному рівні достовірних даних при вивченні біоеквівалентності відповідних генеричних препаратів.

В И С Н О В К И

Запропонована методика пробопідготовки для імуноферментного визначення залишкових кількостей доксицикліну у зразках м'язових та паренхіматозних тканин курчат на рівні 5 мкг/кг чутлива, експресна і точна, що дозволяє використовувати з цією метою набір для ІФА, розроблений під іншу цільову матрицю (мед, креветки). Методика була запропонована виробникові тест-набору для затвердження, оскільки вона відповідає вимогам Директиви ЄС 2002/657/ЄС. Адаптовану методику для визначення високих концентрацій доксицикліну у зразках плазми крові цим тест-набором можна застосовувати для дослідження біоеквівалентності ветеринарних препаратів.

Перспективи досліджень. Розроблена методика підготовки зразків м'яса та печінки курчат для визначення залишкових кількостей доксицикліну дозволить виробничим, контрольним та науковим лабораторіям проводити скринінгові 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 №1180 Держпродспоживслужби України з питань безпечності харчових продуктів від 05.12.2019.

References

- Anadon, A., Martinoz-Larranaga, M.R., Diaz, M.J., Bringas P., Formandoz M.C., Formandoz-Cruz, M., Iturbo, J., Martinoz, M.A. (1994). Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens. Avian Pathology. 23. 79-90. DOI.org/10.1080/03079459408418976.
- Aronson, A.L. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. Journal of American Veterinary Medicine Associations. 176. 1061-1068.
- Axisa, B., Naylor, A.R., Bell, P.R.F., Thompson, M.M. (2000). Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues. Journal of Chromatography B. 744. 359-365. DOI:10.1016/s0378-4347(00)00261-9.

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.

Das, S., Al Faysal, M.N., Ferdous, J., Sachi, S., Islam, M.S., Sikder, M.H. (2019). Detection of oxytetracycline and doxycycline residue in different growth stage of commercial broiler. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. 17(1). 7-14. DOI.org/10.33109/bjvmjj19am2.

Davis, J.L., Jacklyn, M.S., Salmpn, H., Mark, B.S., Papich, G. (2006). Pharmacokinetics and tissue distribution of doxycycline after oral administration of single and multiple doses in horses. *American Journal of Veterinary Research* 67(2). 310-316. DOI. 10.2460/ajvr.67.2.310.

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.

Gaida, A., Posyniak, A., Pietruszka, K. (2008). Analytical procedure for the determination of doxycycline residues in animal tissues by liquid chromatography. *Bulletine of Veterinary Institute Pulawy*. 52(3). 417-420.

Gaida, A., Posyniak, A., Tomczyk, G. (2014). LC-MS/MS analysis of doxycycline residues in chicken tissues after oral administration. *Bulletine of Veterinary Institute Pulawy*. 58(3). 573-579. DOI: 10.2478/bvip-2014-0089.

Hsiao, P.F., Chang, S.K., Hsu, T.H., Li, K.P., Chou, C.C. (2016). Pharmacokinetics and tissue depletion of doxycycline administered at high dosage to broiler chickens via the drinking water. *Acta Veterinaria Hungarica*. 64. 472-481. DOI: 10.1556/004.2016.044.

Hosnia, S.A.-M., Manal, A.M.M., Awad, A.-H.I. (2015). Tetracycline residues in intensive broiler farms in upper Egypt: hazards and risks. *Journal of World's Poultry Research*. 5(3). 48-53.

Kogawa, A.C., Salgado, H.R.N. (2012). Doxycycline hyclate: a review of properties, applications and analytical methods. *International Journal of Life Science & Pharma Research*. 2(4). 11-25.

Laczay, P., Semjen, G., Lehel, J., Nagy, G. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in fasted and nonfasted broiler chickens. *Acta Veterinaria Hungarica*. 49(1). 31-37. DOI: 10.1556/AVet.49.2001.1.5.

Luis, J. Castro, Ana M. Sahagum, M. Jose Diez, Nelida Fernandez, M. Sierra, Garcia, J.J. (2009). Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration. *The Veterinary Journal*. 180. 389-395. DOI:10.1016/j.tvjl.2008.02.001.

Meijer, L.A., Ceysens, K.G.F., de Greve, B.I.J.A.C., de Bruijn, W. (1993). Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. *Veterinary Quarterly*. 15. 1-5. DOI:10.1080/01652176.1993.9694358.

Nguyen, F., Starosta, A.L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D.N., (2014) Tetracycline antibiotics and resistance. *Biological Chemistry*. 395(5). 559-75. DOI:10.1515/hsz-2013-0292

Riond, J.-L., Tyszkowska, K., Riviere, E. (1989). Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in calves with mature or immature rumen function. *American Journal of Veterinary Research*. 50(8). 1329-1333. PMID: 2782715.

Santos, M.D.F., Vermeersch, H., Remon, J.R., Schelkens, M., de Backer, P., van Bree, H.J.J., Ducatelles, R., Haesebrouck, F. (1996). Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 19. 274-280.

Tekeli, I.O., Turk, E., Corum, D.D., Corum, O., Kirgiz, F.C., Uney, K. (2020). Pharmacokinetics, bioavailability and tissue residues of doxycycline in Japanese quails after oral administration. *Food Additives & Contaminants. Part A*. 37(12) 2082-2092 DOI.org/10.1080/19440049.2020.1825827.

Yang, F., Si, H.B., Wang, Y.Q., Zhao, Z.S., Zhou, B.H., Hao, X.Q. (2016). Pharmacokinetics of doxycycline in laying hens after intravenous and oral administration. *British Poultry Science*. 57(4). 576-580. DOI: 10.1080/00071668.2016.1184228.

Yang, F., Yang, F., Wang, G., Kong, T. (2018). Pharmacokinetics of doxycycline after oral administration of single and multiple dose in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1-5. DOI: 10.1111/jvp.12699

Wijayanti, A.D.& Rosetyadewi, A.W. (2011). The comparison of doxycycline residue in the meat of broiler chickens administered in feed and water. *Journal of Animal Science and Technology*. 175-178. DOI: 10.5398/medpet.2011.34.3.175.