

Development and Evaluation of the Suitability of the Method for Determining the Content of Egg Coccidiostatics using Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)

O.V. Bayer[†], O.V. Kaminska[†], L.V. Shevchenko^{*‡}, V.M. Mykhalska[‡], O.M. Stupak[†], O.V. Bondarets[†], Yu.V. Dobrozhan[†]

[†] State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, 30, Donetska st., Kyiv, Ukraine, 02000;

[‡] National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15, Heroyiv Oborony st., Kyiv, Ukraine, 03041; *e-mail: shevchenko_laris@ukr.net

Received: March 14, 2019; Accepted: April 16, 2019

DOI: 10.17721/moca.2019.43-51

The conducted studies assessed the suitability of the method of ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and established the MS/MS detection parameters and determined its validation characteristics for the analysis of residual content of coccidiostatics in food eggs. It has been proved that this method is accurate, practical and universal, which is confirmed by the data of CC_α for amprolium – 2.14 µg/kg, diclazuril – 2.37 µg/kg, monensin – 2.34 µg/kg, narazin – 2.28 µg/kg, semduramicin – 2.23 µg/kg, toltrazuril 2.5 – µg/kg, salinomycin – 3.32 µg/kg, halofuginone – 6.18 µg/kg, maduramycin – 13.06 µg/kg, decoquinat – 2.37 µg/kg, robenidine – 26.06 µg/kg, nicarbazine – 316.7 µg/kg, percentage of return is 92.4 – 111 %. The results obtained for assessing the suitability, accuracy and reproducibility of the results meet the requirements of the European Directives. The developed method allows to detect residual amounts of about 12 coccidiostatics that are used in poultry for the prevention of coccidiosis.

Keywords: coccidiostatics, residual content, liquid chromatography, mass spectrometry, food eggs

Розробка та оцінка придатності методу визначення вмісту кокцидіостатиків у яйцях за допомогою недефективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (PX-МС/МС)

O.V. Байєр[†], O.V. Камінська[†], Л.В. Шевченко^{*‡}, В.М. Михальська[‡], O.M. Ступак[†], O.V. Бондарець[†], Ю.В. Доброжан[†]

[†] Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, 30, вул. Донецька, Київ, Україна, 02000;

[‡] Національний університет біоресурсів і природокористування України, 15, вул. Героїв Оборони, Київ, Україна, 03041; *e-mail: shevchenko_laris@ukr.net

Надійшла: 14 березня 2019 р; Прийнята: 16 квітня 2019 р

DOI: 10.17721/moca.2019.43-51

Проведеними дослідженнями здійснено оцінку придатності методу недефективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (PX-МС/МС) та встановлено параметри МС/МС детектування і визначено його валідаційні характеристики для аналізу залишкового вмісту кокцидіостатиків у яйцях харчових. Доведено, що цей метод є точним, практичним та універсальним, що підтверджується даними CC_α для ампроліуму – 2.14 мкг/кг, диклазурилу – 2.37 мкг/кг, монензину – 2.34 мкг/кг, наразину – 2.28 мкг/кг, семдураміцину – 2.23 мкг/кг, толтразурилу – 2.5 мкг/кг, саліноміцину – 3.32, галофугінону – 6.18 мкг/кг, мадураміцину – 13.06 мкг/кг, декоквінату – 2.37 мкг/кг, робенідину – 26.06 мкг/кг, нікарбазину – 316.7 мкг/кг, відсоток повернення складає 92.4 – 111 %. Одержані результати щодо оцінки придатності, точності і відтворності результатів задовольняють вимоги Європейських директив. Розроблений метод дозволяє виявляти залишкові кількості близько 12 кокцидіостатиків, які застосовуються в птахівництві для профілактики кокцидіозів.

Ключові слова: кокцидіостатики, залишковий вміст, рідинна хроматографія, мас-спектрометрія, яйця харчові

Нині Україна є одним з найбільших експортерів м'яса та яєць птиці у країни Європи та Азії. Ефективність виробництва харчових яєць суттєво залежить не лише від продуктивності птиці, але й від її фізіологічного стану, терміну експлуатації, вартості кормів, кормових добавок і засобів захисту поголів'я від інфекційних та інвазійних захворювань. До останніх належать також кокцидіози – одна з найпоширеніших хвороб у птахівництві. Викликають її найпростіші роду *Eimeria*, які паразитують в епітеліальних клітинах кишківника, рідше – печінки та жовчовивідних шляхів у птахів. Розмножуються еймерії у кишечнику тракті птиці, що призводить до порушення процесів травлення і всмоктування поживних речовин, зневоднення організму, кровотеч і підвищеної чутливості до інших збудників хвороб та масової загибелі поголів'я [1]. Тому лікування та профілактика кокцидіозу у птахівництві є одним з важливих завдань фахівців ветеринарної медицини. З цією метою у птахівництві використовують низку препаратів групи кокцидіостатиків: монензин, наразин, саліноміцин, мадураміцин, ласалоцид, галофугінон тощо [2,3]. Проте деякі з них, наприклад, галофугінон та мадураміцин, які мають найбільшу антикокцидійну активність, є досить токсичні для організму і можуть накопичуватися у тканинах та продукції птиці [4-6].

Як будь-які ксенобіотики, кокцидіостатики здатні негативно впливати також і на стан здоров'я людини, потрапляючи в організм з продуктами харчування тваринного походження, у тому числі яйцями та м'ясом [7]. Тому в країнах Європейського Союзу існують регламентуючі акти на використання та залишковий вміст кокцидіостатиків у продукції птахівництва та кормах [8-10]

Для більшості кокцидіостатиків встановлені чіткі періоди очікування (каренції), протягом яких м'ясо та яйця непридатні в їжу людині. При плановому застосуванні кокцидіостатиків їх вилучають із кормів за декілька діб до забою, а термін їх каренції залежить від діючої речовини препарату [11].

При вивченні кумулятивної здатності кокцидіостатиків було виявлено їх залишки в харчових яйцях, а саме в яєчному білку та жовтку [12, 13]. Виведення залишків цих препаратів із жовтка харчових яєць триває близько 10 днів. Однак, якщо концентрація введеного препарату дуже висока, а межа виявлення препарату низька, то залишки препарату в жовтку можуть виявлятися протягом 70 днів [14].

Проведеними дослідженнями в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи згідно Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження у 2016 – 2018 роках було виявлено в яйцях та яєчному порошку залишковий

вміст саліноміцину та наразину в концентраціях, які не перевищували МДР (максимально допустимий рівень).

При встановленні лабораторією ветеринарної медицини невідповідності продукції встановленим вимогам, публікується попередження про виявлені відхилення і невідповідність даної продукції вимогам безпеки чинним для конкретної країни чи країн ЄС. Крім того, при встановленні невідповідності якості та безпечності продукції у референсній лабораторії країни-імпортера, ці дані публікуються у загальноєвропейській системі безпеки продуктів.

Всі ці заходи щодо контролю якості і безпечності продукції, у тому числі яєць, на вміст залишкових кількостей кокцидіостатиків обумовлені їх потенційною небезпекою для здоров'я людини. Попередження багатьох країн світу щодо заборони імпорту яєць з залишковими кількостями ветеринарних препаратів вимагає посилення контролю в них залишків цих препаратів, що, у свою чергу, передбачає розробку надійних та чутливих методів їх аналізу.

Для визначення залишкового вмісту кокцидіостатиків у кормах, продуктах харчування та тканинах тварин запропоновано ряд методик з різним діапазоном чутливості [15].

До таких методів належить аналітичний метод аналізу з використанням ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія): з використанням мас-спектрометричного детектора, а також ультрафіолетового детектора.

Для визначення залишкового вмісту кокцидіостатиків у продукції тваринництва також використовують імуноферментний метод аналізу (ІФА). Це вид імунохімічного аналізу, що базується на імунологічній реакції антигену з відповідним антитілом з утворенням комплексу антиген-антитіло, для виявлення якого використовують кон'югати антигену, антитіла або обидва компоненти цієї реакції з ферментами. Індикатором реакції є здатність ензимів викликати руйнування субстрату з утворенням забарвленого продукту.

Метод ІФА заснований на реакції антиген-антитіло, яка відбувається між аналізованими іонофорами і антитілами до нього. Інтенсивність забарвлення субстрату, який додається після відмивання осередків, знаходиться в зворотній залежності від вмісту в пробі іонофорів. Компанія «Стайлаб» пропонує тест-системи для скринінгу іоноформних кокцидіостатиків на основі методу імуноферментного аналізу (ІФА) лише в комбікормах.

На сьогодні розроблено небагато скринінгових методів для виявлення кокцидіостатиків у продукції тваринного походження та кормах, оскільки при використанні ELISA методу тест системи специфічні до кожного кокцидіостатика та видів матриці [16]. Так, наприклад, нікарбазин і галофугінон

широко використовуються як кокцидіостатики для профілактики і лікування кокцидіозу у птиці, тому у Бельгії був розроблений метод для визначення тільки двох показників у яйцях та м'язах. Було показано, що випадкове перехресне забруднення кормів може призвести до залишків цих сполук у яйцях та м'язах [17]. Також існують тест-системи для визначення окремо мадураміцину в м'язах та печінці птиці.

Цей метод зручно використовувати для скринінгу проб, оскільки визначення іонофорів методом ІФА не передбачає складну пробопідготовку і апаратуру, але має і окремі недоліки. Як видно з вищевикладеного, тест-системи розраховані виключно під окремі матриці – яйця, м'язи, комбікорми та не охоплюють весь перелік існуючих кокцидіостатиків, а розроблені лише для визначення мадураміцину, нікарбазину та галофугінону.

Існує ще один метод визначення вмісту кокцидіостатиків у різних матрицях, який належить до скринінгових, він ґрунтується на принципі ІФА – це використання біо-чип-аналізатора фірми Rendox (Великобританія) зі стандартними зразками і матеріалами. Використання даного обладнання дозволяє визначити всі відомі кокцидіостатики у яйцях та м'язах птиці: ампроліум, диклазурил, монензин, наразин, саліноміцин, декоквінат, семдураміцин, нікарбазин, толтразурил, галофугінон, мадураміцин, клопідол, лазолоцид. Але цей метод залишається скринінговим та при виявленні позитивних результатів потребує підтвердження на високочутливому обладнанні РХ-МС/МС.

Моніторинг залишків кокцидіостатиків у тканинах тварин і яйцях харчових виконують у всіх європейських країнах [18]. Для цього використовували методи, в основному засновані на ВЕРХ з використанням класичного ультрафіолетового та флуоресцентного детекторів, які дозволяють визначити єдиний клас сполук або просто окремі аналіти. Так, були опубліковані методи визначення іоноформних кокцидіостатиків з використанням постколоночної дериватизації [19]. Такий метод використовували для визначення вмісту лазолоциду з флуоресцентним детектуванням [20], нікарбазину [21], галофугінону [22], робенідину [23] з використанням ВЕРХ УФ. Використання цього методу дозволяє визначити лише окремі показники, такі як лазолоцид, робенідин, галофугінон, нікарбазин та не охоплює весь перелік кокцидіостатиків.

Метод мас-спектрометрії (РХ-МС/МС) є підтверджуючим методом для виявлення рівня кокцидіостатиків у тканинах та продукції птиці, має вищу чутливість та охоплює широкий діапазон аналітів. Практично, залишковий вміст всіх кокцидіостатиків у продуктах тваринництва можна визначити за допомогою РХ-МС/МС [24].

Деякі розроблені методи для рідинних хромато-маспектрометрів мають високу вартість, особливо ті, в пробопідготовці яких передбачено використання твердофазних колонок для кращого очищення супернатанту.

Метою нашої роботи було модифікувати та валідувати метод РХ-МС/МС, здатний визначити залишки кокцидіостатиків у яйцях харчових на рівні МДР 2 мкг/кг, виключення становлять галофугінон, мадураміцин, декоквінат, робенідин, нікарбазин для яких встановлені вищі МДР. Пробопідготовка даного методу базується на принципі рідинно-рідинної екстракції, що робить його доступнішим, займає менше часу, але не поступається чутливістю.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Визначення залишкових кількостей кокцидіостатиків проводили на рідинному хроматографі ACQUITY UPLC H-Class з використанням потрійно-квадрольного маспектрометра Waters XEVO TQ-S micro (США) з аналітичною колонкою обернено-фазовою ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μm , 50 mm x 2.1 mm) згідно з нормативним документом.

Для проведення пробопідготовки зразків використовували наступне обладнання: центрифуга з максимальним прискоренням 14000 грм «Eppendorf 5810 R», концентратор проб в тоці азоту «Liebish Labortechnik» з можливістю нагріву до 130 °С, вортекс лабораторний «Stuart Vortex mixer SA8» з частотою обертання 2500 rpm, орбітальний шейкер для пробірок «Stuart Tube Rotator SB 3» з частотою обертання 40 rpm, диспергатор «KA T 25 digital ULTRA-TURRAX» для об'ємів від 1 до 2000 мл з діапазоном частот обертання від 3000 до 25 000 об/хв.

Для підготовки зразків та проведення аналізу використовували реактиви компанії Sigma-Aldrich (Німеччина). Матеріалом дослідження були зразки харчових яєць, додатково перевірені з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії і мас-спектрометрії на відсутність у них залишків кокцидіостатиків.

Збагачення контрольних зразків проводили стандартними розчинами для встановлення ССа залежно від максимально допустимого рівня (МДР). МДР в яйцях харчових встановлений для ампроліуму, диклазурилу, монензину, наразину, семдураміцину, толтразурилу 2 мкг/кг; саліноміцину - 3 мкг/кг, галофугінону - 6 мкг/кг, мадураміцину - 12 мкг/кг, декоквінату - 20 мкг/кг, робенідину - 25 мкг/кг і нікарбазину - 300 мкг/кг. Оцінку придатності методу проводили на рівнях 0.5; 1 та 1.5 МДР.

В роботі використовували сертифіковані

субстанції: ампроліум, диклазурил, монензин, наразин, саліноміцин, декоквінат, семдураміцин, нікарбазин, толтразурил, галофугінон, мадураміцин фірми Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, США).

Основні стандартні розчини з концентрацією 1 мг/мл вказаних кокцидіостатиків готувались шляхом розчинення в ацетонітрилі.

Робочі стандартні розчини кожного кокцидіостатика та комплексний стандартний розчин усіх кокцидіостатиків готували шляхом двостадійного розведення основних стандартних розчинів: в першій стадії - ацетонітрилом (до концентрації 10 мкг/мл), а в другій (до концентрації 100 нг/мл) - 0.1 % мурашиною кислотою.

Для контролю точності вимірювання (контролю часу утримання та відсотку повернення кокцидіостатиків) використовували також внутрішні стандартні розчини диклазурил (Diclazuril 6-carboxyl acid) та робенідин (Robenidin d-8 hydrochloride). Кількісне визначення масової концентрації кокцидіостатиків проводили методом зовнішнього стандарту за здійсненням попередньо калібруванням хроматографа за градувальними розчинами з використанням матриці. Ідентифікацію кокцидіостатиків проводили за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності.

Підготовку зразка проводили за наступною схемою: попередньо були гомогенізовані яйця в кількості 10 шт за допомогою диспергатора «IKA T 25 digital ULTRA-TURRAX», потім до наважки гомогенізованих яєць в кількості 2 г вносили суміш стандартних розчинів та суміш внутрішніх стандартних розчинів, після струшування додавали 20 мл ацетонітрилу для екстрагування. Після змішування дослідного зразка протягом 30 хв. на шутелі проводили центрифугування при радіальному прискоренні 4000 об/хв. протягом 10 хв. Після цього відбирали 10 мл екстракту в поліпропіленову пробірку та випаровували досуха під струменем азоту за температури 60 °С. Потім перерозчиняли одержаний сухий залишок у 500 мкл розчину ацетонітрил: вода (80:20). Після змішування суміші на вортексі протягом 2 хв. проводили її фільтрування.

Дослідження вмісту кокцидіостатиків у яйцях харчових проводили на потрійно-квадрупольному мас-спектрометрі Waters XEVO TQ-S micro (США) з відповідними параметрами сканування (Табл. 1). Напруга електророзпилення встановлювалася на рівні 3.0 і 2.5 кВ для позитивного і негативного режимів відповідно. Температури десольвації та джерела були встановлені на рівні 450 та 150 °С, відповідно. Газ висушування - азот з потоком 900 L/hr, газ зіткнення аргон.

Хроматографування зразків проводили в градієнтному режимі, система 0.1 % розчин мурашиної кислоти в воді (А) / ацетонітрил (В),

швидкість потоку 0.6 мл/хв., змінювався в залежності від часу 0-3 хв - 95 % А; 4-7 хв - 5 % А; 7.1-8 хв - 95 % А. Температура хроматографічної колонки була встановлена на рівні 40 °С. Режим введення зразка автоматичний, об'єм інжекції 10 мкл.

Підтверджуючий метод був валідований у відповідності до Рішення Єврокомісії 2002/657/ЕС [25]. Протягом процедури валідації встановлено такі параметри: специфічність, селективність, точність, лінійність, внутрішня лабораторна відтворюваність, відсоток витягу, межа прийняття рішення (CC_a) та здатність виявлення (CC_p). Всі ці дані отримали з використанням програмного забезпечення Interval Software компанії quo data GmbH (Німеччина).

CC_a - показник для оцінювання придатності підтверджуючих методів, а CC_p - для скринінгових. CC_a - межа рішення, вище якої можна прийти до висновку з імовірністю помилки α , що зразок є невідповідним. CC_p - це найменший вміст досліджуваної речовини, який можна виявити, ідентифікувати або визначити кількісно у пробі з імовірністю похибки ρ .

Всі ці параметри визначали при проведенні оцінки придатності методу контрольних зразків харчових яєць (всього 32 зразки), які попередньо були додатково проаналізовані на відсутність у них цільового аналіту. Збагачення аналітом проводили на рівнях 0; 0.5; 1; 1.5 МДР (валідаційного рівня), дослідження проводилися 2 дні двома операторами.

Точність методу оцінювали за підрахунком середньостатистичного відхилення результатів, отриманих для кожної концентрації.

Витяг вираховували за концентрацією навантажених певною кількістю аналіту контрольних зразків. CC_a та CC_p визначали за калібрувальною кривою, побудованою при збагаченні різними концентраціями стандарту матриці, як описано у ISO 11843 [26].

Межу прийняття рішення (CC_a) та CC_p вираховували у відповідності до міжнародного стандарту ISO 11843-2 [26]. Аналітичні параметри CC_a та CC_p були розраховані застосовуючи матричні калібрувальні криві та стандартні відхилення. Криві були побудовані з використанням цільового аналіту та внутрішнього стандарту при співвідношенні їх площ.

Згідно Commission decision 657 від 2002 року [25] при валідації аналітичних методів, результати вважаються прийнятні, якщо CV (коефіцієнт варіації) не перевищує меж вказаних у Таблиці 2 на різних рівнях.

Таблиця 1. Параметри сканування даних для проведення досліджень на потрійно-квадрупольному мас-спектрометрі Waters XEVO TQ-S micro.

Компонент	Материнський іон	Дочірні іони	Напруга на конусі	Енергія зіткнення
Хімічні кокцидіостатики(скануються ESI -)				
Диклазурил	405.10	334.10	35.00	17.00
	407.10	336.10		15.00
Нікарбазин	300.80	107.00	25.00	35.00
		136.90		13.00
Толтразурил	424.00	41.90	25.00	20.00
		99.00		20.00
Диклазурил-с6 (внутрішній стандарт)	743.00	336.00	35.00	21.00
Іонофорні кокцидіостатики (скануються ESI +)				
Ампроліум	243.30	94.00	25.00	11.00
		150.10		24.00
Галофугінон	414.30	100.09	30.00	23.00
		138.08		25.00
Декоквінат	418.30	204.00	30.00	45.00
		232.00		35.00
Мадураміцин	934.64	629.41	35.00	25.00
		647.40		25.00
Монензин	693.81	461.36	50.00	45.00
		675.46		36.00
Наразин	787.20	431.24	55.00	50.00
		531.37		45.00
Робенідин	334.20	138.00	50.00	24.00
		155.00		22.00
Робенідин d8 (внутрішній стандарт)	342.20	199.20	50.00	20.00
Саліноміцин	773.51	413.28	55.00	50.00
		431.27		55.00
Семдураміцин	895.80	833.90	35.00	30.00
		851.90		40.00

Таблиця 2. Приклади на відтворюваність CV для кількісного методу в області аналізу масових часток.

Масова частка	Відтворюваність CV (%)
< 1 мкг/кг	*
1-10 мкг/кг	32*
10-100 мг/кг	23
100-1000 мкг/кг (1 мг/кг)	16

* Для масових часток менших ніж 100 мкг/кг застосування рівняння Хорвіца дає неприпустимо високі значення. Тому, CV для концентрацій менших ніж 100 мкг/кг повинні бути якнайменшими.

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведених досліджень, з використанням програмного забезпечення «Inter VAL V.3.4.0.4 Quo data» (Німеччина) були отримані валідаційні дані для різних кокцидіостатиків, а саме для саліноміцину, монензину, наразину, диклазурилу, нікарбазину, ампроліуму, галофугінону, декоквінаку, мадураміцину, робенідину, семдураміцину, толтразурилу.

Критичні концентрації CC_a та CC_p для зазначених кокцидіостатиків та рівень інтересів наведені в Таблиці 3.

В Таблиці 4 вказані стандартні відхилення повторюваності та відтворюваності в мкг та коефіцієнти варіації у % та відсоток повернення на різних калібрувальних рівнях (дані отримані після обробки програмним забезпеченням).

Таблиця 3. Критичні концентрації CC_a та CC_p для кокцидіостатиків та рівень інтересів, мкг/кг.

Кокцидіостатик	Рівень інтересів	CC_a	CC_p
Саліноміцин	3.0	3.32	3.97
Монензин	2.0	2.34	3.0
Наразин	2.0	2.28	2.91
Диклазурил	2.0	2.37	3.0
Нікарбазин	300	316	345
Ампроліум	2.0	2.14	2.37
Галофугінон	6.0	6.18	6.52
Декоквінак	20.0	21.92	25.16
Мадураміцин	12.0	13.0	14.98
Робенідин	25.0	26.0	27.88
Семдураміцин	2.0	2.33	2.64
Толтразурил	2.0	2.5	3.0

Таблиця 4. Повторюваність, внутрішня лабораторна відтворюваність та відсоток повернення кокцидіостатиків.

Кокцидіостатик	Концентрація, мкг/кг	s_p , мкг/кг	Rel. s_p , %	s_{WR} , мкг/кг	Rel. s_{WR} , %	Відсоток повернення, %
Саліноміцин	1.500	0.124	8.200	0.124	8.200	106.0
	2.250	0.128	5.700	0.128	5.700	102.3
	3.000	0.130	4.300	0.149	5.000	100.5
	3.750	0.132	3.500	0.207	5.500	99.3
	4.500	0.133	3.000	0.271	6.000	98.6
Монензин	1.000	0.138	13.8	0.138	13.8	109.5
	1.500	0.148	9.9	0.148	9.9	102.0
	2.000	0.154	7.7	0.154	7.7	98.2
	2.500	0.158	6.3	0.178	7.1	96.0
	3.000	0.160	5.3	0.216	7.2	94.5
Наразин	1.000	0.090	9.0	0.090	9.0	104.9
	1.500	0.093	6.2	0.093	6.2	101.7
	2.000	0.095	4.7	0.129	6.4	100.0
	2.500	0.096	3.8	0.184	7.4	99.0
	3.000	0.096	3.2	0.245	8.2	98.4
Диклазурил	1.000	0.128	12.8	0.128	12.8	99.3
	1.500	0.131	8.7	0.146	9.7	97.2
	2.000	0.132	6.6	0.173	8.6	96.2
	2.500	0.133	5.3	0.191	7.6	95.6
	3.000	0.134	4.5	0.203	6.8	95.2

Таблиця 4. (продовження).

Кокцидіостатик	Концентрація, мкг/кг	s_r , мкг/кг	Rel. s_r , %	s_{WR} , мкг/кг	Rel. s_{WR} , %	Відсоток повернення, %
Нікарбазин	150.000	7.473	5.0	7.473	5.0	103.9
	225.000	7.584	3.4	7.584	3.4	102.4
	300.000	7.641	2.5	8.175	2.7	101.6
	375.000	7.675	2.0	9.002	2.4	101.2
	450.000	7.698	1.7	9.717	2.2	100.9
Ампроліум	1.000	0.043	4.3	0.075	7.5	99.1
	1.500	0.043	2.8	0.069	4.6	99.2
	2.000	0.043	2.1	0.066	3.3	99.2
	2.500	0.043	1.7	0.065	2.6	99.2
	3.000	0.043	1.4	0.067	2.2	99.2
Галофугінон	3.000	0.095	3.2	0.095	3.2	100.7
	4.500	0.095	2.1	0.095	2.1	100.7
	6.000	0.095	1.6	0.095	1.6	100.6
	7.500	0.095	1.3	0.095	1.3	100.6
	9.000	0.095	1.1	0.095	1.1	100.6
Декоквінат	10.000	0.869	8.7	0.869	8.7	103.0
	15.000	0.907	6.0	0.907	6.0	98.6
	20.000	0.927	4.6	0.927	4.6	96.5
	25.000	0.940	3.8	0.940	3.8	95.2
	30.000	0.948	3.2	0.948	3.2	94.3
Мадураміцин	6.000	0.392	6.5	0.392	6.5	104.0
	9.000	0.402	4.5	0.402	4.5	101.6
	12.000	0.407	3.4	0.502	4.2	100.3
	15.000	0.410	2.7	0.608	4.1	99.6
	18.000	0.412	2.3	0.709	3.9	99.1
Робенідин	12.500	0.409	3.3	0.409	3.3	101.0
	18.750	0.415	2.2	0.415	2.2	99.4
	25.000	0.419	1.7	0.492	2.0	98.6
	31.250	0.421	1.3	0.612	2.0	98.1
	37.500	0.422	1.1	0.736	2.0	97.8
Семдураміцин	1.000	0.092	9.2	0.092	9.2	108.2
	1.500	0.095	6.4	0.095	6.4	104.7
	2.000	0.097	4.8	0.107	5.4	102.9
	2.500	0.098	3.9	0.124	5.0	101.9
	3.000	0.099	3.3	0.140	4.7	101.2
Толтразурил	1.000	0.130	13.0	0.154	15.4	111.6
	1.500	0.143	9.5	0.177	11.8	102.0
	2.000	0.150	7.5	0.205	10.3	97.2
	2.500	0.154	6.2	0.242	9.7	94.3
	3.000	0.157	5.2	0.284	9.5	92.4

Примітка: s_r – repeatability standard deviation (стандартне відхилення повторюваності); Rel. s_r – коефіцієнт варіації повторюваності перерахований у %; s_{WR} – in-house reproducibility standard deviation (стандартне відхилення внутрішньолабораторної відтворюваності); Rel. s_{WR} – коефіцієнт варіації відтворюваності, перерахований в %.

Як видно з даних Таблиці 4, при аналізі зразків яєць з концентрацією саліноміцину від 1.5 до 4.5 мкг/кг відсоток повернення складав 98.6 - 106.0, для монензину від 1.0 до 3.0 мкг/кг – 94.5 - 109.5, для наразину від 1.0 до 3.0 мкг/кг – 98.4 до 104.9, для диклазурилу від 1.0 до 3.0 мкг/кг - 95.2 - 99.3, для нікарбазину 100.9 - 103.9 мкг/кг, для ампроліуму від 1.0 до 3.0 мкг/кг - 99.1 - 99.2, для галофугінону від 3.0 до 9.0 мкг/кг - 100.6 - 100.7, для декоквінату від 10.0 до 30.0 мкг/кг - 94.3 - 103.0, для мадураміцину, від 6.0 до 18.0 мкг/кг - 99.1 - 104.0, для робенідину від 12.5 до 37.5 мкг/кг - від 97.8 до 101.0, для семдураміцину від 1.0 до 3.0 мкг/кг – 101.2 - 108.2 і для толтразурилу задовольняє вимоги Commission Decision 2002/657/EC [25].

Коефіцієнт варіації відтворюваності результатів аналізу вмісту кокцидіостатиків у яйцях харчових знаходився в межах прийнятних значень, а саме для кокцидіостатиків з масовою часткою 1-10 мкг/кг: саліноміцин, монензин, наразин, диклазурил, ампроліум, галофугінон, семдураміцин та толтразурил він не перевищував 32%; для кокцидіостатиків з масовою часткою 10-100 мг/кг: декоквінат, мадураміцин та робенідин він не перевищував 23%; і для кокцидіостатиків з масовою часткою 100-1000 мг/кг: нікарбазин він був нижче 16%, що узгоджується з даними Таблиці 2.

З отриманих даних можна зробити висновок, що всі результати, одержані при розрахунку відтворюваності та повторюваності, входять у допустимі межі згідно рішення ЄС 657/2002 на різних рівнях валідації [25].

Акредитовані вітчизняні лабораторії ветеринарної медицини, в основному, визначають показники безпеки необроблених харчових продуктів тваринного походження скринінговими методами, і, відповідно до рішення ЄС 657/2002, для виконання національних планів Державного моніторингу залишкових Коефіцієнт варіації кількостей ветеринарних препаратів та забруднюючих речовин в організмі живих тварин, продуктах тваринного походження і кормах, а також харчових продуктах, підконтрольних ветеринарній службі, у разі отримання позитивних скринінгових результатів необхідно проводити дослідження в акредитованих лабораторіях із застосуванням підтверджуючих методів, чим і являється наш метод.

В рамках виконання вище наведеного плану Державного моніторингу в лабораторії науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи за 2015-2018 роки було проаналізовано 1307 зразків харчових яєць на вміст кокцидіостатиків. При цьому встановлено, що з 525 зразків харчових яєць, які надійшли в лабораторію для аналізу у 2016 році, 20 % містили залишки кокцидіостатиків (нікарбазин і саліноміцин) у концентрації, що не перевищувала МДР.

У 2017 році з 400 зразків харчових яєць, залишки кокцидіостатиків було виявлено у 15 % проб, тоді як у першому півріччі 2018 року з 156 зразків яєць, які перевіряли на залишковий вміст саліноміцину, монензину, нікарбазину, наразину, диклазурилу, результати виявилися негативними.

Також, нами були проведені дослідження харчових яєць, призначених для експорту. Так, у 2016 році було досліджено 79 зразків яєць, у 2017 - 22 зразки, 2018 (перше півріччя) - 16 зразків.

Залишків кокцидіостатиків не було виявлено в жодному зразку.

Таким чином, вище викладені результати досліджень показали, що в окремих випадках в яйцях харчових виявляються залишкові концентрації різних кокцидіостатиків, що підтверджує необхідність їх контролю з використанням високочутливих методик та відповідного обладнання.

Заключення

Проведено оцінювання придатності методу недефективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (РХ-МС/МС) та встановлено параметри МС/МС детектування і визначено його валідаційні характеристики для аналізу залишкового вмісту кокцидіостатиків у яйцях харчових. Даний метод є точним, практичним та універсальним, що підтверджується отриманими даними CC_a для ампроліуму – 2.14 мкг/кг, диклазурилу – 2.37 мкг/кг, монензину – 2.34 мкг/кг, наразину – 2.28 мкг/кг, семдураміцину – 2.23 мкг/кг, толтразурилу – 2.5 мкг/кг, саліноміцину – 3.32, галофугінону – 6.18 мкг/кг, мадураміцину – 13.06 мкг/кг, декоквінату – 2.37 мкг/кг, робенідину – 26.06 мкг/кг, нікарбазину – 316.7 мкг/кг, відсоток повернення складає 92.4 – 111%. Ці результати задовольняють вимоги Європейських директив.

В даному методі використовується проста процедура приготування проб та можуть аналізуватися як позитивні, так і негативні іонізовані речовини при одночасному введенні. Ці переваги забезпечують економічну ефективність, швидкість і високу пропускну здатність аналізу залишкових кількостей кокцидіостатиків у продуктах харчування, у тому числі у яйцях.

Розроблений та впроваджений метод недефективної рідинної хроматографії – тандемної мас-спектрометрії (РХ-МС/МС) в роботу лабораторії дозволяє виявляти залишкові кількості кокцидіостатиків, які застосовуються в птахівництві на території України. Оцінка придатності методу проведена в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи підтверджує його чутливість, точність методу додатково забезпечується використанням внутрішніх дейтерованих стандартів (Diclazuril 6-carboxyl acid та Robenidin d-8 hydrochloride).

Література

1. Long P. L. The Biology of the Coccidia. N.Y. 1982.
2. Stephan B., Rommel M., Daugschies A., Haberkom A. Studies of resistance to anticoccidials in Eimeria field isolates and pure Eimeria strains. *Veterinary Parasitology*. 1997. 69. P. 19–29.
3. Zavala G., Anderson D.A., Davis J.F., Dufour-Zavala L. Acute monensin toxicosis in broiler breeder chickens. *Avian Dis*. 2011, Sep;55 (3): 516–21. DOI: 10.1637/9708-030911-Case.1
4. Dowling L. Ionophore toxicity in chickens: a review of pathology and diagnosis. *Avian Pathology*. 1992, 21, 355–368.
5. Chalmers G. A. Monensin toxicity in broiler chickens. *Can Vet J*. 1981, 22(1), 21–22.
6. Conway D. P., Mathis G. F., Johnson J., Schwartz M., Baldwin C. Efficacy of Diclazuril in Comparison with Chemical and Ionophorous Anticoccidials Against Eimeria spp. in Broiler Chickens in Floor Pens. *Poultry Science*. 2001, 80, 426–430. DOI: 10.1093/ps/80.4.426
7. Peeters J. E., Derijcke J., Verlinden R., Wyffels R. Sensitivity of avian Eimeria spp. to seven chemical and five ionophore anticoccidials in five Belgian integrated broiler operations.- *Avian Diseases*. 1994, 38, 483–493.
8. Commission regulation (EC) No 167/2008 of 22 February 2008 concerning a new authorization for ten years of a coccidiostat as an additive in feedingstuffs.
9. Commission Implementing Regulation (EU) No 388/2011 of 19 April 2011 concerning the authorization of maduramicin ammonium alpha as a feed additive for chickens for fattening (holder of authorization Alpharma (Belgium) BVBA) and amending Regulation (EC) No 2430/1999.
10. Commission regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed.
11. Krasnianchuk I. V. Efektyvne likuvannia koktsydiozu. *Tvarynystvo sohodni. Rozdil: Veterynariia*. 2015, 2–5. (in Ukr.).
12. Donoghue D. J., Hairston H. Food Safety Implication: Certain Antibiotics May Rapidly Contaminate Egg Albumen during the Process of its Formation. *British Poultry Science*. 2000, 41, 174–177.
13. Donoghue D. J., Myers K. Imaging Residue Transfer into Egg Yolks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48 (12), 6428–6430.
14. Arnold D., Somogyi A. Chloramphenicol Residues in Edible Tissues of Food Animals. Proceedings 2nd World Congress on Foodborne Infections Berlin, 1986. P. 832–836.
15. Shankar B. P., Manjunatha Prabhu B. H., Chandan S., Ranjith D, Shivakumar V. Rapid methods for detection of veterinary drug residues in meat. *Veterinary World*. 2010, 3(5), 241–246.
16. CRLs (2010): Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (Initial validation and transfer). Community Reference Laboratories 20/1/2010. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf
17. Huet AC., Mortier L., Daeseleire E., Fodey T., Elliott C., Delahaut P. Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA. *Food Additives and Contaminants*. 2005, 22(2), 128–134. DOI: 10.1080/02652030500038041
18. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. OJ L 1996, 125, 10–31.
19. Gerhardt G. C., Salisbury C.D.C., Campbell H. M. Determination of ionophores in the tissues of food animals by liquid chromatography. *Food Addit Contam*. 1995, 12, 731–737.
20. Kozak A., Wiśniewska-Dmytrow H.: Determination of lasalocid residues in animal tissues. *Medycyna Wet*. 1995, 51, 160–161.
21. Primus T.M., Kohler D.J., Goodall M.A., Yoder C., Mathies T., Miller L., Johnston J.J., Vercauteren K.: Liquid chromatographic determination of 4,4'-dinitrocarbanilide, the active component of the infertility agent nicarbazin, in chicken, duck, goose and snake eggs. *JAOAC Int*. 2003, 86, 1144–1148.
22. Yamamoto Y., Kondo F. Determination of halofuginone and amprolium in chicken muscle and egg by liquid chromatography. *JAOAC Int*. 2001, 84, 43–46.
23. Dowling G., O'Keeffe M., Smyth M.R.: Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Anal Chim Acta*. 2005, 539, 31–34.
24. Francesca Buiarelli, Patrizia Di Filippo, Carmela Riccardi, Donatella Pomata, Luigi Giannetti, Bruno Neri and Daniela Rago. (2017). Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Analysis of Synthetic Coccidiostats in Eggs. *Separations*. 4. 15. 10.3390/separations4020015.
25. Commission Decision 2002/657/EC, 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Europ. Comm.*, No. L 221/8. http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi
26. ISO 11843 Capability of detection. Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case, 2003.