

Comparative Studies of Feed Samples on Salinomycin Contamination using Screening and Confirmatory Methods

D.V. Yanovych, Z.S. Zasadna, M.V. Rydchuk*, S.I. Plotytsia, S.M. Kislova, O.M. Pazderska, S.M. Melikyan, H.L. Mysko

National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues Control, State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Donetska Str. 11, 79019 Lviv, Ukraine;
*e-mail: mariana.rydchuk@gmail.com

Received: December 19, 2021; Accepted: May 30, 2022

DOI: 10.17721/moca.2022.81-90

The article presents the results of development of feed samples preparation method for further testing on salinomycin residues by ELISA using Salinomycin ELISA test kit, manufactured by Beijing Kwinbon Biotechnology (China) for another target matrix: tissues and eggs. Comparative study by means of different extractants and conditions of analyte extraction from feed was carried out, and recoveries' percentages were established. Optimal conditions for two-stage extraction with methanol saline solution followed by ethyl acetate extraction from alkaline medium were experimentally selected; with further analyte concentration by evaporation and dry residue reconstitution. Application of this technique makes it possible to determine salinomycin residues in feed samples at the level of 0.35 - 0.70 mg/kg with absolute recovery of ~ 70%. Suitability of the method was confirmed by comparative study of actually contaminated feed samples, performed by two screening methods: ELISA and TLC, and confirmatory method UHPLC-MS/MS. Developed technique has main advantages: it is simple, rapid and cost effective. Elaborated ELISA method is recommended for salinomycin residues determination at the level of cross-contamination on feed production and can be utilized in routine laboratory tests to prevent economic losses, caused by mortality of poultry and non-target animals, and to prevent salinomycin residues accumulation in food.

Keywords: salinomycin, cross-contamination, feed, ELISA, TLC, UHPLC-MS/MS

Порівняльні дослідження зразків кормів на забруднення саліноміцином скринінг-методами та методом підтвердження

Д.В. Янович, З.С. Засадна, М.В. Ридчук*, С.І. Плотиця, С.М. Кіслова, О.М. Паздерська, С.М. Мелікян, Г.Л. Мисько

Національна референс-лабораторія з контролю залишкових кількостей діючих речовин ветеринарних препаратів та кормових добавок, Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок; вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна; *e-mail: mariana.rydchuk@gmail.com

Надійшла: 19 грудня 2021 р.; Прийнята: 30 травня 2022 р

DOI: 10.17721/moca.2022.81-90

У статті представлено результати розробки способу підготовки зразків кормів для проведення подальшого дослідження на вміст залишків саліноміцину методом імуно-ферментного аналізу тест-наборами Salinomycin ELISA Kit виробництва Beijing Kwinbon Biotechnology (Китай), призначеного для аналізу інших цільових матриць, а саме – тканин та яєць. Виконано порівняльне дослідження способів підготовки зразків корму із застосуванням різних екстрагентів та умов проведення екстрагування аналіту з кормів із встановленням ступеня його вилучення. Експериментально обґрунтовано та вибрано оптимальні умови проведення двоетапного екстрагування сольовим розчином метанолу з наступним екстрагуванням етилацетатом з лужного середовища, концентрування аналіту шляхом висушування та відновлення сухого залишку. Використання цього способу підготовки зразків корму дає можливість визначити залишки саліноміцину у зразках корму на рівні 0.35 – 0.70 мг/кг з абсолютним ступенем вилучення ~70%. Придатність методики підтверджено порівняльним дослідженням реально забруднених зразків кормів, проведеним двома скринінг-методами: імуноферментним аналізом і тонкошаровою хроматографією, а також ультрависокоєфективною рідинною хроматографією з тандем-мас-спектрометричним детектуванням як методом підтвердження. Основними перевагами розробленої методики є простота виконання, експресність та економічна ефективність. Розроблена скринінг-методика імуноферментного аналізу рекомендується для визначення залишків саліноміцину на рівні перехресного забруднення при виробництві кормів та може бути використана для рутинних лабораторних досліджень з метою запобігання економічним збиткам у зв'язку з загибеллю нецільових тварин та птиці, а також запобігання нагромадження залишків саліноміцину у продуктах харчування.

Ключові слова: саліноміцин, перехресне забруднення, корми, ІФА, ТШХ, УВЕРХ-МС/МС

Поліетерні іонофорні кокцидіостатики (ласалоцид, монензин, саліноміцин, наразин, мадурамицин і семдурамицин) – це речовини, які продукуються 53 різними штамами бактерій роду *Streptomyces*. Молекули цих сполук містять кілька тетрагідрофуранових кілець, з'єднаних у спірокетальну структуру, вони утворюють комплексні солі з різними іонами металів, зокрема, натрію, калію та кальцію, і тому здатні їх переносити через мембрани клітин. У птахівництві кокцидіостатики широко використовують як кормову добавку для профілактики та лікування кокцидіозу, викликаного найпростішими роду *Eimeria* spp. [1]. Кури-бройлери отримують кокцидіостатики з кормом впродовж усього життя, тоді як для курей-несучок їх використання заборонене [2]. Кокцидіостатики не застосовують у гуманній медицині, оскільки вони мають негативний вплив на серцево-судинну систему [3], спричиняючи порушення серцевих скорочень в досліджуваних групах [4]. Існують дослідження, які вказують на потенційну можливість використання поліетерних іонофорів як інгібіторів реплікації РНК вірусу SARS-CoV-2, що є збудником захворювання COVID-19 [5].

Експериментально не доведено прямого ризику для здоров'я споживачів від вживання продуктів тваринного походження із залишками препаратів, отриманих при годівлі тварин кормом, забрудненим на рівні 10% від максимального дозвального рівня (МДР). Для того, щоб уникнути залишків кокцидіостатиків у сировині тваринного походження, залежно від діючої речовини антикокцидального препарату, встановлено їх періоди каренції, яких потрібно дотримати перед забоєм після припинення згодовування птиці лікувального корму з кокцидіостатиком. Так, наприклад, термін каренції становить 3 дні для монензину та 5 днів для ласалоциду, наразину, мадурамицину, семдурамицину і саліноміцину [6].

Саліноміцин – поліетерний іонофорний антибіотик (рис. 1), що синтезується ферментацією штаму *Streptomyces albus*, був вперше виділений із ґрунту.

Він проявляє різну токсичну дію на курчат-бройлерів, індичат, овець, телят, коней, зокрема, може викликати пригнічення росту, гостру інтоксикацію, набряк легень, кардіоміоліз, ураження нирок, некроз печінки. Причиною такого токсичного впливу кормів може бути передозування чи неомогенність готових кормів при змішуванні з концентрованим преміксом, або випадкове використання лікувальних кормів нецільовим видам тварин [7].

Щоб запобігти економічним збиткам через загибель або зменшення продуктивності курчат та індиків, а також уникнути накопичення залишків саліноміцину у продуктах харчування (м'ясо, печінці, яйцях), призначених для споживання людиною, готові корми необхідно регулярно контролювати на забруднення цим кокцидіостатиком. Для визначення поліетерних іонофорів у кормах використовують метод вискоэффективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з флуоресцентним [8,9] або УФ-детектуванням [10–14]. Підготовка зразків передбачає попереднє очищення аналіту твердофазним екстрагуванням або післяколонкову дериватизацію. Межі визначення аналіту (LOQ) переважно перевищують 1 мг/кг, а для ласалоциду та наразину – 0.5 мг/кг [8, 11]. Метод рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (РХ-МС) також доволі часто використовують для визначення поліетерних іонофорів у кормі [15–20]. Цей метод дозволяє значно підвищити чутливість та селективність визначення аналіту при комплексному аналізі зразків матриць, оскільки його можна використовувати для моніторингу як одного обраного, так і багатьох іонів. У цьому випадку для підготовки зразків з метою очистки екстракту аналіту від впливу матриці часто використовують твердофазну екстракцію. Метод РХ-МС дозволяє виявляти поліетерні іонофори в діапазоні від 0.001 до 50 мг/кг. Щоправда, у дослідженнях авторів [5,6,18] запропоновані методи були протестовані лише з лікувальними кормами, а не з реальними перехресно забрудненими зразками немедикаментозних кормів.

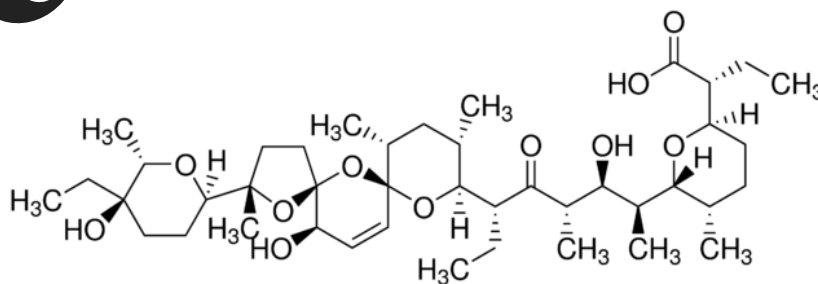


Рис. 1. Структурна формула саліноміцину.

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) також використовують для скринінгу залишкових кількостей кокцидіостатиків у продуктах харчування тваринного походження, зокрема, іонофорів. Ці методики, як правило, не передбачають складної пробопідготовки, а очистка і концентрування зразка відбувається шляхом екстракції в системі «рідина – рідина». У літературі є повідомлення про результати виявлення залишків поліефірних іонофорів у яйцях і тканинах, спричинене забрудненням кормів при виробництві [22, 23]. Так, більшість тест-систем на саліноміцин розраховані для аналізу конкретної матриці тваринного походження – м'язових тканин, печінки чи яєць [1]. Однак, немає інформації щодо можливості застосування відомих тест-систем для визначення вмісту саліноміцину в кормах.

Директивою Європейської Комісії 2009/8/ЕС та Наказом Міністерства аграрної політики та продовольства України №131 від 19.03.2012 р. встановлений максимально допустимий рівень для поліефірних іонофорів в кормах для нецільових тварин (0.05 мг/кг для мадураміцину, 0.25 мг/кг для семдураміцину, 1.25 мг/кг для ласалоциду та монензину, а також 0.7 мг/кг для наразину та саліноміцину) [24, 25].

Тому метою наших досліджень була розробка способу підготовки зразків кормів для визначення залишків саліноміцину тест-наборами Salinomycin ELISA Kit виробництва Beijing Kwinbon Biotechnology (Китай), призначеного для аналізу тканин та яєць, підтвердження можливості використання цього скринінг-методу для визначення саліноміцину на рівні допустимих рівнів перехресного забруднення кормів; встановлення можливості застосування цього методу для аналізу як лікувального, так і забрудненого корму; порівняння результатів щодо вмісту саліноміцину в реальному забрудненому кормі, отриманих скринінг-методом ІФА та принципово іншим скринінговим методом, а саме – тонкошаровою хроматографією (ТШХ), а також методом підтвердження – рідинною хроматографією з tandem-мас-спектрометричним детектуванням (РХ-МС/МС).

Матеріали та методи дослідження

Реактиви. Вода надчиста (система Direct-Q 3, Millipore, Франція), метанол (for HPLC, Sigma Aldrich, Німеччина), форміатна кислота (Riedel-de-Haën, Німеччина), ацетонітрил (for HPLC, Sigma-Aldrich, Німеччина), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich, Німеччина), амоній гідрофосфат (Sigma-Aldrich, Німеччина), натрій хлорид (Sigma-Aldrich, Німеччина), натрій гідроксид (Sigma-Aldrich, Німеччина), аміак (Riedel-de-Haën, Німеччина), гексан (for HPLC, Lab-Scan, Польща), хлороформ (for HPLC, Lab-Scan, Польща), дихлорометан (for HPLC, Sigma-Aldrich, Німеччина).

Стандарти. Стандарт натрієвої солі саліноміцину (VETRANAL® analytical standard,

Sigma-Aldrich, Німеччина). Вихідний стандартний розчин саліноміцину з концентрацією 1.0 мг/мл готували розчиненням його точної наважки в метанолі. Кратним розведенням вихідного стандартного розчину отримували розчини саліноміцину в метанолі з концентраціями 100 мкг/мл, 10 мкг/мл та 1 мкг/мл, які надалі використовували для побудови калібрувальних графіків та для стандартних добавок.

Обладнання. Рідинний хроматограф Waters ACQUITY UPLC H-Class з tandemним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Waters Xevo TQ-S Micro, обладнаний колоною ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 50 mm $\times$ 2.1 mm) із передколоною ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (1.7 μ m, 5 mm $\times$ 2.1 mm) фірми Waters. Планшетний рідер Labsystems iEMS Reader MF (BioRad, Фінляндія) довжина хвилі 450 нм. Пристрій для тонкошарової хроматографії CAMAG NANOMAT 4 (CAMAG AG, Швейцарія).

Допоміжне лабораторне обладнання: ваги лабораторні AXIS AD 200 та AXIS AD 200C (AXIS, Польща); центрифуга MULTIFUGE 1S-R (Thermo Scientific, США); центрифуга Sigma 1-16K (Sigma, Німеччина); орбітальний шейкер Multi Bio RS-24 (Biosan, Латвія); вортекс MAX MIX II (Barnstead Thermolyne, США); магнізатор Rotor Swiss made (Rotor Lips AG, Швейцарія); роторний вакуумний випарювач LABOROTA 4002 (Heidolph, Німеччина); центрифужний вакуумний випарювач Genevac EZ-2 Envi (Genevac, Англія); ультразвукова баня Elmasonic S 120 H (Elma, Німеччина).

Зразки кормів. Як чистий контрольний корм у роботі використовували корм для птиці, отриманий лабораторією для рутинних досліджень, який, згідно з попередньо проведеним аналізом методом УВЕРХ-МС/МС, не містив саліноміцину. Дослідні реальні зразки, забруднені саліноміцином, – зразки корму для птиці, що надійшли в лабораторію на аналіз методом ТШХ на вміст саліноміцину (зразки «№ 6» і «№ 7», згідно з маркуванням та з супровідними документами замовника).

Приготування зразків для дослідження методом імуноферментного аналізу. Зважували 2 г перемеленого зразка корму в 15 мл центрифужну поліпропіленову пробірку. Додавали 8 мл сольового розчину метанолу (1.6% розчин натрій хлориду в 80% метанолі). Струшували на вортексі впродовж 20 с і центрифугували 10 хв за 4700 об./хв температури 10 °С. 2 мл верхньої фракції переносили в 50 мл центрифужну поліпропіленову пробірку, додавали 4 мл 0.5 М розчину натрій гідроксиду, струшували на вортексі впродовж 20 с, додавали 15 мл етилацетату, знову струшували на вортексі впродовж 20 с, а потім на орбітальному шейкері впродовж 10 хв на швидкості 60 об./хв. Центрифугували 10 хв за швидкості 4700 об./хв і температури 10 °С. Переносили 10 мл верхньої

фракції у скляну пробірку для випаровування. Екстракт висушували за температури 40 °С за допомогою роторного вакуумного випарювача. Сухий залишок відновлювали в 1 мл екстракційного буферу з тест-набору та додатково розводили екстракційним буфером з урахуванням вмісту аналіту відносно стандартних розчинів саліноміцину калібрувального ряду, що надається у наборі. Імуноферментний аналіз проводили на тест-наборах *Salinomycin ELISA Kit (Cat. No. KA04901H)* фірми Beijing Kwinbon Biotechnology (Китай) для визначення залишкових кількостей саліноміцину у зразках тканин та яєць.

Приготування зразків для дослідження методом тонкошарової хроматографії. У конічну колбу номінальним об'ємом 100 мл зважували 10 г перемеленого зразка корму, попередньо відібраного від середньої проби, додавали 40 мл метанолу, ретельно перемішували на вортексі. Екстрагування продовжували в ультразвуковій бані впродовж 10 хв за температури 30 °С. Енергійно перемішували на вортексі впродовж 5 хв. Отриманий екстракт очищали фільтруванням крізь паперовий фільтр, кількісно переносили у скляну пробірку зі шліфом необхідного об'єму та висушували за температури 40 °С за допомогою роторного вакуумного випарювача. Сухий залишок зразка розчиняли у 5 мл метанолу, ретельно омиваючи стінки пробірки, перемішували на вортексі і додатково осаджували центрифугуванням. На відповідно активовану хроматографічну пластинку HPTLC Silica gel 60F₂₅₄ (Merck) розміром 10×10 см з товщиною шару нерухомої фази 0.25 мм наносили підготовлені зразки кормів та стандартних розчинів. Нанесення розчинів на пластинку здійснювали мікропіпетками з капілярним закінченням або спеціальними капілярами для ТШХ, або мікроприціпами, при постійному підсушуванні мокрих плям потоком теплого повітря. Розмір плям нанесення не повинен перевищувати 3 мм у діаметрі. Висушену пластинку з нанесеними зразками ставили у горизонтальну хроматографічну камеру, насичену парами рухомої фази 1 (хлороформ), щільно закривали кришкою та насичували протягом 20 хв. Стартовий край пластинки занурювали в рухому фазу 1 так, щоб фронт пройшов дистанцію по нерухомій фазі до відстані 0.5 см до протилежного краю пластинки. Пластинку виймали з камери, висушували на повітрі за кімнатної температури. Переставляли її у хроматографічну камеру, насичену парами рухомої фази 2 (етилацетат насичений водою у співвідношенні 10:5). Процедуру розділення повторювали, як і у рухомій фазі 1. Після розділення пластинку висушували, обприскували 3 % розчином ваніліну в підкисленому метанолі і витримували у сушильній шафі, попередньо прогрітій до 120 °С, впродовж 1 хв для проявлення зон розділення аналіту. Хроматографічну пластинку зі зразками та стандартами саліноміцину аналізували візуально.

Приготування зразків для дослідження методом УВЕРХ-МС/МС. Зважували 5 г перемеленого зразка корму в 50 мл центрифужну поліпропіленову пробірку. Додавали 10 мл органічного екстрагенту (25 % гексану, 25 % дихлорометану, 25 % ацетонітрилу, 25 % етилацетату). Струшували на вортексі впродовж 20 с, а потім на орбітальному шейкері впродовж 20 хв на швидкості 60 об./хв. Витримували зразки в ультразвуковій бані за кімнатної температури впродовж 15 хв. Центрифугували 10 хв за швидкості 4700 об./хв і температури 10 °С. Переносили верхню фракцію у скляну пробірку для випаровування. До осадового залишку додавали 8 мл органічного екстрагенту. Струшували на шейкері впродовж 20 хв за швидкості 60 об./хв. Центрифугували 10 хв за швидкості 4700 об./хв і температури 10 °С. Переносили верхню фракцію і об'єднували з попередньо відібраною. Екстракт висушували за температури 40 °С за допомогою центрифужного вакуумного випарювача. До сухого залишку вносили 5 мл ацетонітрилу і струшували за допомогою вортекса впродовж 20 с. Витримували зразки в ультразвуковій бані за кімнатної температури впродовж 5 хв. Центрифугували 5 хв за швидкості 1500 об./хв. Додавали 4 мл ацетонітрилу, 1 мл води, 2 мл гексану, струшували за допомогою вортекса впродовж 30 с. Екстракт переносили в 15 мл поліпропіленові пробірки. Центрифугували 10 хв за швидкості 4700 об./хв і температури 10 °С. Верхню фракцію (гексан) відкидали, відбирали 2.5 мл ацетонітрильно-водної фази. Аліквоту цього розчину розводили в 25 разів 90 % ацетонітрилом. В свою чергу, аліквоту цього ацетонітрильного екстракту розводили в 10 разів 40 % водним розчином метанолу і переносили у віали для хроматографічного аналізу. Зважаючи на орієнтовний вміст аналіту в зразку корму, фактор розведення за необхідності збільшували так, щоб у підсумку приблизна концентрація саліноміцину у віалі знаходилась в межах калібрувального графіка.

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 – 0.5 мл/хв. Об'єм інжекції – 10 мкл. Температура колонки – 40 °С. Час розділення – 4.5 хв. Час виходу саліноміцину – 1.79 хв.

Розділення проводили за таким градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А, %	Мобільна фаза В, %
0:00	50.0	50.0
0:25	50.0	50.0
1:50	0	100.0
2:50	0	100.0
3:50	50.0	50.0
4:00	50.0	50.0

Параметри роботи тандем-мас-спектрометричного детектора: іонне джерело – електророзпилювач (ESI); режим іонізації – ES⁺; температура джерела (Source Temperature) – 150°C; температура висушування (Desolvation Temperature) – 600°C; газ зіткнення (Collision Gas) – аргон; тиск аргону: 4.0×10^{-3} mbar; газ висушування (Desolvation Gas) – аргон; потік газу висушування – 1000 л/год; газ розпилення (Nebulisation Gas) – азот; потік газу розпилення – 50 л/год; час сканування (Dwell) – 0.025 с; режим сканування мас – MRM (режим моніторингу множинних реакцій). Параметри сканування характеристичних іонів аналіту наведено у таблиці 1.

Визначення вмісту саліноміцину в зразках кормів (мг/кг) виконували згідно з калібрувальними графіками, побудованими на матриці чистого контрольного зразка, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати досліджень та їх обговорення

Запропонований виробником набір для визначення вмісту саліноміцину розрахований на дослідження зразків тканин (м'язових та паренхіматозних) та яєць. У зв'язку зі зростанням попиту на дослідження кормів на вміст саліноміцину на забруднення на рівні МДР (0.7 мг/кг) мета нашої роботи полягала у розробці методики підготовки зразків кормів для визначення залишків цього аналіту. На сьогоднішній день в лабораторії з цією метою успішно використовують метод тонкошарової хроматографії на пластинках з шаром силікагелю. Однак цей метод дозволяє виконувати визначення вмісту саліноміцину у зразках кормів на рівні 2 мг/кг, що перевищує допустиму норму забруднення кормів цим аналітом.

Після аналізу наукової літератури нами було запропоновано три основні методи підготовки зразків кормів та їх модифікації для визначення вмісту саліноміцину методом ІФА. До чистих контрольних зразків корму вносили добавки стандартного розчину саліноміцину, що надається у наборі, на рівні $0.5 \times \text{МДР}$ та МДР (0.35 та 0.70 мг/кг, відповідно). За першою методикою аналіт екстрагували сумішшю метанол : ацетонітрил (3 : 1) за кімнатної температури на орбітальному шейкері, розділяли центрифугуванням тверду та органічну фази, випаровували зразок до сухого залишку для концентрування аналіту, відновлювали сухий залишок у екстракційному буфері з тест-набору. Друга методика передбачала двоступеневе екстрагування

аналіту: спочатку сольовим розчином метанолу, а потім – етилацетатом з лужного середовища; концентрування органічної фази після попереднього розділення фаз центрифугуванням, відновлення сухого залишку у екстракційному буфері. За третьою методикою досліджувані кокцидіостатик екстрагували також двоступеневе – сольовим розчином метанолу з подальшим екстрагуванням дихлорометаном з лужного середовища, центрифугували для розділення фаз, концентрували аналіт в органічній фазі шляхом висушування на роторному вакуумному випаровувачі, сухий залишок відновлювали екстракційним буфером. Кожен варіант прободготовки також перевіряли, застосовувавши додаткове знежирення відновленого екстракту зразка гексаном.

Підготовлені у двох повторях за описаними схемами зразки чистого корму без добавки та з добавками стандартного розчину саліноміцину аналізували тест-набором *Salinomycin ELISA Kit* за методикою, наданою виробником набору, після додаткового розведення з урахуванням вмісту аналіту відносно стандартних розчинів саліноміцину калібрувального ряду, що надається у наборі. Результати проведених досліджень наведено у таблиці 2.

За наведеними в таблиці 2 даними і з урахуванням впливу матриці на визначену кількість аналіту, дещо завищений відсоток вилучення отримано для зразків корму із добавками стандартного розчину саліноміцину з тест-набору після екстракції дихлорометаном з лужного середовища, що може бути пов'язано, наприклад, з певною випадковою похибкою при реалізації цієї схеми екстракції аналіту або з похибкою при введенні в зразок корму добавки стандарту саліноміцину. Спосіб підготовки зразків кормів з використанням екстракції етилацетатом дає можливість досягнути ступеня вилучення на рівні 117 та 77% для зразків корму із добавкою саліноміцину на рівні $0.5 \times \text{МДР}$ та МДР, відповідно. Натомість, при екстрагуванні аналіту сумішшю метанол:ацетонітрил (3:1) досягається ступінь вилучення, значно нижчий, ніж з використанням двох попередніх способів.

Використання процедури знежирення гексаном відновленого екстракційним буфером сухого залишку екстракту зразка перед його аналізуванням тест-набором призводить до часткового переходу аналіту в органічну фазу, і, відповідно, до певного зниження відсотку вилучення, залежно від способу екстрагування (табл. 2).

Таблиця 1. Параметри сканування іонів саліноміцину мас-спектрометричним детектором.

Аналіт	Прекурсор-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Продукт-іон, m/z	Енергія зіткнення (Collision Energy), V
Salinomycin	774.5	18	265.3	22
			431.8	22
			532.1	22

Таблиця 2. Результати порівняльних досліджень способів підготовки зразків корму для визначення вмісту залишків саліноміцину методом ІФА.

Спосіб екстрагування аналіту	Внесено саліноміцину, мкг/кг	Визначено саліноміцину, мкг/кг	Ступінь вилучення, %
Екстрагування сумішшю метанол : ацетонітрил (3 : 1)	0	7	-
	350	243	68
	700	450	63
Екстрагування сумішшю метанол : ацетонітрил (3 : 1) і знежирення гексаном	0	6	-
	350	174	48
	700	434	61
Екстрагування етилацетатом зі сольового розчину метанолу	0	12	-
	350	421	117
	700	549	77
Екстрагування етилацетатом зі сольового розчину метанолу і знежирення гексаном	0	12	-
	350	250	68
	700	401	56
Екстрагування дихлорометаном зі сольового розчину метанолу	0	-	-
	350	379	108
	700	418	131
Екстрагування дихлорометаном зі сольового розчину метанолу і знежирення гексаном	0	0	-
	350	339	97
	700	749	107

Слід зазначити, що при використанні усіх досліджених способів пробопідготовки матричний вплив зразка був невеликим, а за екстракції дихлорометаном – практично нульовим, як видно із даних, наведених в таблиці 2, для чистих (без добавки) зразків корму.

Оскільки запропонований метод ІФА має на меті одночасний скринінг великої кількості зразків, то використання дихлорометану як екстрагента у такій роботі є достатньо проблемним, у зв'язку з хімічними особливостями та враховуючи достатньо високий відсоток вилучення аналіту з матриці, оптимальним варіантом пробопідготовки корму вважаємо екстракцію саліноміцину зі зразків сольовим розчином метанолу та етилацетатом з лужного середовища, без додаткової очистки відновленого екстракту гексаном.

Для порівняння та додаткової оцінки придатності розробленого способу підготовки зразків корму для визначення рівня забруднення саліноміцином, проведено дослідження реальних зразків корму, що надійшли в лабораторію на аналіз, методом ТШХ (зразки № 6 і № 7, згідно з маркуванням виробника). Цей скринінг-метод ґрунтується на ідентифікації саліноміцину у зразках кормів після його екстрагування, концентрування шляхом висушування органічного екстракту корму, та розділення на силікагелевій пластинці з метою адсорбції аналіту із кормової матриці. Хроматограми розділення зразків кормів № 6 і № 7 наведено на рис. 2. На хроматографічній пластинці позначено: 1, 2, 5, 6, 9 – точки нанесення по 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 та 8.0 мкл розчину стандартного

зразка натрієвої солі саліноміцину з концентрацією 100 мкг/мкл; 3, 7 – по 10.0 мкл підготованого екстракту зразка корму № 6; 4, 8 – по 10.0 мкл підготовленого екстракту зразка корму № 7. Для проявлення зон розділення хроматографічну пластинку обробляли 3 % розчином підкисленого ваніліну, який при нагріванні реагує з іонофором, надаючи йому пурпурового забарвлення. Отримані зони розділення досліджуваних зразків корму порівнювали візуально з відповідними зонами розділення стандартного зразка саліноміцину, оцінюючи інтенсивність забарвлення і розмір їх основних плям, а також коефіцієнт утримування (R_f). Так, для саліноміцину натрію $R_f = 0.58$. Зони розділення розчинів стандартного зразка саліноміцину натрію співпадають з плямами на треках розчинів екстрактів досліджуваних зразків кормів.

Оскільки методи ІФА та ТШХ належать до скринінг-методів, то за отримання позитивного результату необхідно проводити додаткове дослідження підтверджуючим методом, у нашому випадку – це розроблена нами УВЕРХ-МС/МС методика, яка дозволяє кількісно визначити перехресне забруднення кормів саліноміцином з межею визначення (LOQ) 50 мкг/кг (межа виявлення (LOD) – 25 мкг/кг). На рис. 3 наведено хроматограми підготовлених екстрактів досліджуваних кормів (зразки № 6 і № 7), контрольного зразка корму без добавки та з добавкою саліноміцину на рівні 10 мкг/кг, а на рис. 4 – калібрувальний графік, побудований на матриці чистого корму в діапазоні концентрацій аналіту в кормі від 0 до 10 мкг/кг.

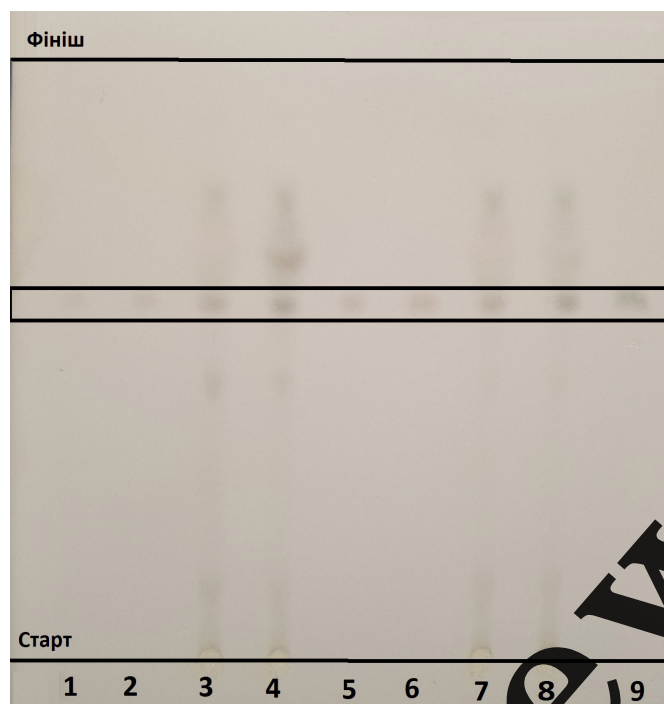


Рис.2. ТШХ хроматограми досліджуваних зразків кормів та стандартного зразка саліноміцину: 1, 2, 5, 6, 9 – точки нанесення по 2.0, 3.0, 4.0, 6.0 та 8.0 мкл розчину стандартного зразка саліноміцину натрію з концентрацією 100 нг/мкл; 3, 7 – по 10.0 мкл підготованого екстракту зразка корму № 6; 4, 8 – по 10.0 мкл підготованого екстракту зразка корму № 7.

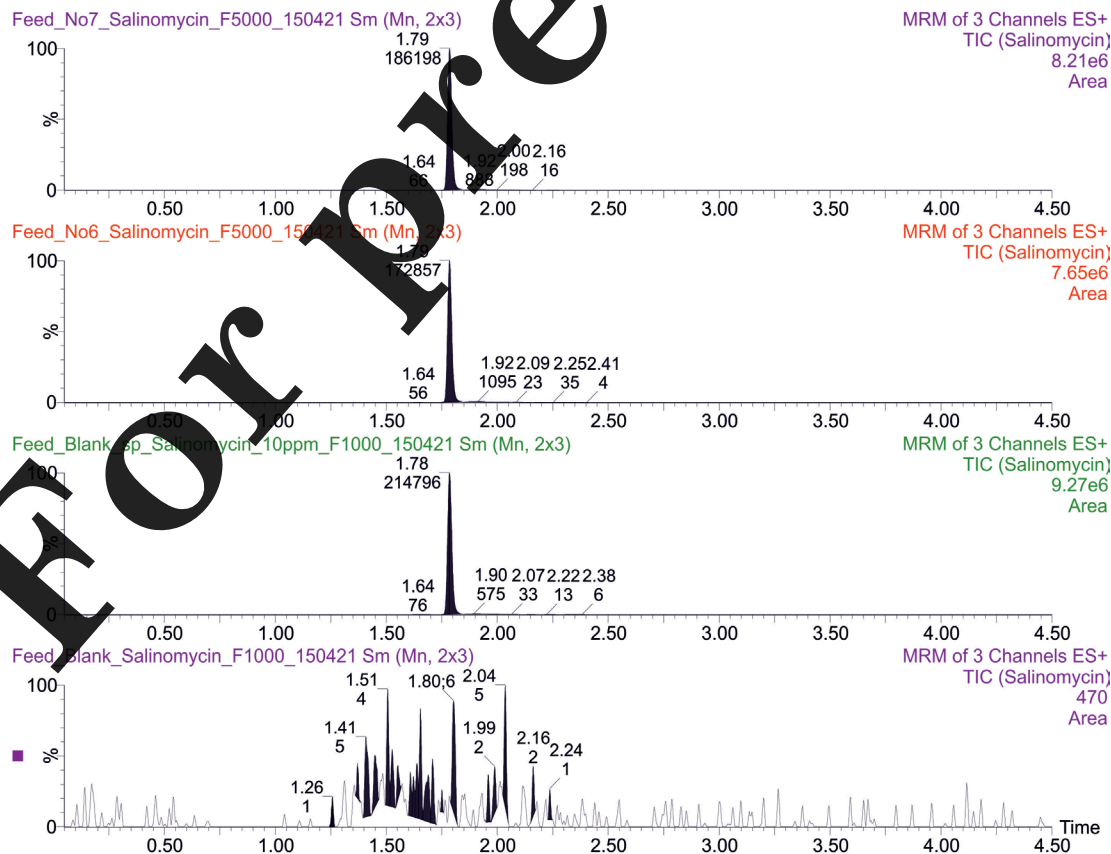


Рис.3. Хроматограми екстрактів зразків контрольного (чистого) корму без добавки (а); контрольного корму з добавкою 10 мг/кг саліноміцину (b); досліджуваного корму № 6 (c) та досліджуваного корму № 7 (d).

Compound name: Salinomycin
Correlation coefficient: $r = 0.999541$, $r^2 = 0.999082$
Calibration curve: $45329.1 \cdot x + -207.181$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

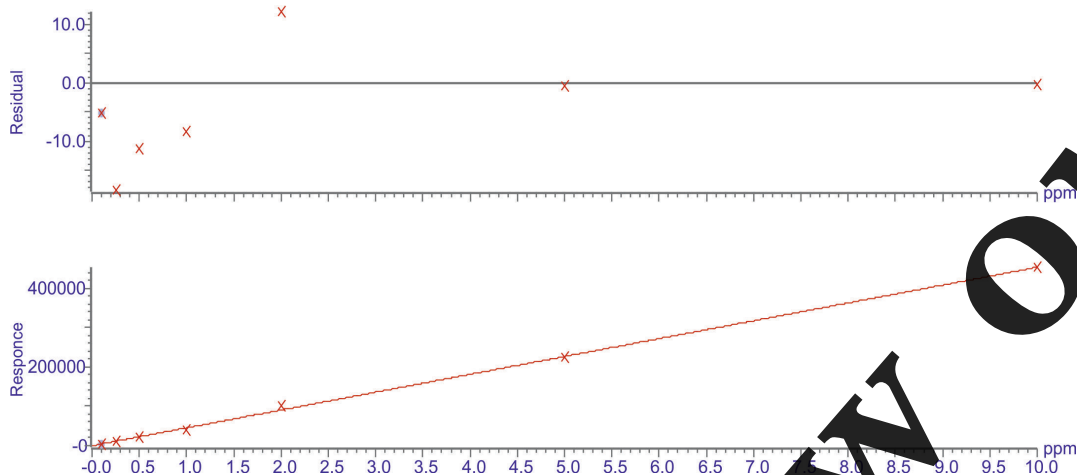


Рис. 4. Калібрувальний графік для визначення залишків саліноміцину в діапазоні 0 – 10 мг/кг у зразках кормів, побудований на матриці.

Результати порівняльних досліджень зразків корму, проведених методами ІФА, ТШХ та УВЕРХ-МС/МС, наведено в таблиці 3.

Як видно з даних таблиці 3, результати скринінгових досліджень практично співпадають. Так, у зразку № 6 визначений вміст саліноміцину становив 20.9 і 20.0 мг/кг, а у зразку № 7 – 32.1 і 35.0 мг/кг, згідно з результатами аналізу, проведеного методами ІФА і ТШХ, відповідно. Аналіз зразків кормів підтверджуючим методом УВЕРХ-МС/МС (23.0 мг/кг саліноміцину у зразку № 6 та 34.0 мг/кг в зразку № 7), враховуючи довірчі інтервали, засвідчив придатність розробленої

методики прободготовки зразків корму для визначення рівня його забруднення саліноміцином методом ІФА. Відхилення результатів, отриманих скринінг-методами, розраховані щодо даних, отриманих методом підтвердження, не перевищують допустимих меж для знайденого вмісту аналіту (від -20% до +10% для масового вмісту аналіту ≥ 10 мкг/кг) [26,27]. Слід зазначити, що кратні розведення відновлених екстрактів кормів, проведені із врахуванням діапазонів калібрувальних графіків обох методів, не вплинули суттєво на похибку результатів аналізу, отриманих як методом ІФА, так і методом УВЕРХ-МС/МС.

Таблиця 3. Порівняльне дослідження вмісту саліноміцину у зразках кормів методами ІФА, ТШХ та УВЕРХ-МС/МС ($n = 3$; $P = 0.95$).

Метод дослідження зразків	Зразок	Визначено саліноміцину, мг/кг	Коефіцієнт варіації (CV), %	Відхилення**, %
ІФА	№ 6	20.9 ± 2.6	12.5	-9.1
	№ 7	32.1 ± 3.4	10.6	-5.6
ТШХ*	№ 6	20	-	-13.0
	№ 7	35	-	2.9
УВЕРХ-МС/МС	№ 6	23.0 ± 1.4	6.1	-
	№ 7	34.0 ± 2.7	7.9	-

* при застосуванні методу ТШХ зразки кормів аналізували однократно

** розраховано відносно результатів, отриманих підтверджуючим методом УВЕРХ-МС/МС

Висновки

Вперше розроблено спосіб підготовки зразків корму для проведення аналізу на вміст залишків саліноміцину методом імуноферментного аналізу тест-наборами Salinomycin ELISA Kit виробництва Beijing Kwinbon Biotechnology, призначеного для аналізу тканин та яєць. Встановлено, що з точки зору ефективності та зручності застосування для одночасного скринінгу великої кількості зразків, оптимальним варіантом пробопідготовки корму є екстракція саліноміцину зі зразків сольовим розчином метанолу та етилацетатом з лужного середовища, без додаткової очистки відновленого екстракту гексаном. Цей спосіб дає можливість визначати забруднення кормів саліноміцином на рівні 0.35 - 0.70 мг/кг (0.5 × МДР та МДР, відповідно). Додатково придатність розробленого способу підготовки зразків корму для подальшого аналізу

з використанням тест-наборів Salinomycin ELISA Kit було підтверджено за допомогою порівняльних досліджень реальних зразків, забруднених саліноміцином, скринінг-методом ТШХ та розробленим нами підтверджуючим УВЕРХ-МС/МС методом.

Це дослідження було проведено в рамках виконання комерційних замовлень від виробників кормів та птахофабрик щодо аналізу кормів методами ІФА, ТШХ і УВЕРХ-МС/МС на вміст задекларованих та не задекларованих ветеринарних препаратів, в тому числі – на забруднення кормів кокцидіостатиками, та реалізації науково-дослідної тематики Національної референс-лабораторії з контролю залишкових кількостей діючих речовин ветеринарних препаратів та кормових добавок.

Література

- Clarke L., Fodey T.L., Crooks S.R.H., et al. A review of coccidiostats and the analysis of their residues in meat and other food. *J. Meat Sci.* 2014 97 (3), 358–374.
- Jones J.E., Solis J., Hughes B.L., Castaldo D.J., et al. Production and egg-quality responses of White Leghorn layers to anticoccidial agents. *J. Poult Sci.* 1990 69 (3), 378–387.
- Kabell G., Saini R.K., Somani P., et al. Effects of the carboxylic ionophore monensin on regional blood flow in normal and ischemic myocardium in anesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1979 219 (1), 231–237.
- Levy J.V., Inesi G. Positive inotropic effect on isolated human atrial muscle produced by the ionophore X 537A: preliminary report. *J. Clin. Pharmacol.* 1974 14 (1), 32–34.
- Esben B., Svenningsen J., Thyrsted J.-C., et al. Ionophore antibiotic X-200 is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *Antivir. Res.* 2021 185, 104988.
- European Food Safety Authority. Cross-contamination of non-target feedingstuffs by maduramicin authorised for use as a feed additive. Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. Question N° EFSA-Q-2005-220F. *The EFSA Journal* 2008 594, 1-30.
- Ashrafielani J., Eisapour H., Erfani A.M., et al. High mortality due to accidental salinomycin intoxication in sheep *Interdiscip. J. Toxicol.* 2014 7(3), 173-6.
- Matabudul D.K., Crosby N.T., Lumley I., et al. The optimisation of a rapid method for the determination of lasalocid in poultry feed using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. *J. Food Chem.* 2001 75 (4), 465–471.
- Focht C., Campbell H., Dalgleish J., et al. Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed phase liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2008 91 (3), 479–488.
- Dus G., Gamba V., Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *J. Chromatogr. A.* 1999 835 (1-2), 243–246.
- Thalmann A., Wagner K., Tomassen M., et al. Liquid chromatographic method to determine narasin in feedingstuffs and premixtures: development, validation, and interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 2004 87 (6), 1278–1286.
- de Jong J., Stoisser B., Wagner K., et al. Determination of maduramicin in feedingstuffs and premixtures by liquid chromatography: development, validation, and interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 2004 87 (5), 1033–1041.
- Campbell H., Nayeri G., Costa J.M., et al. Determination of monensin, narasin, and salinomycin in mineral premixes, supplements, and animal feeds by liquid chromatography and post-column derivatization: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2006 89 (5), 1229–1242.
- Tavcar-Kalcher G., Pavsic-Vrtac K., Vengust A. Validation of the procedure for the determination of maduramicin in concentrates, premixes, and feeds by liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 2008. 22, 1–5.
- Wang J., Sporns P., MALDI-TOF MS quantification of coccidiostats in poultry feeds. *J. Agric. Food Chem.* 2000 48 (7), 2807–2811.
- Hormazabal V., Østensvik Ø., Kaldhusdal M. An improved LC-MS method for the determination of lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005 28 (17), 2769–2776.

17. Ebel J.G., Wachs T., Henion J.D. Rapid forensic selected reaction monitoring liquid chromatography/mass spectrometry determination of ionophore antibiotics found at toxic levels in animal feeds. *J. AOAC Int.* 2004 879 (1), 25–30.

18. Vincent U., Chedin M., Yasar S., et al. Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I. Application to targeted feed. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008 47 (4-5), 750–757.

19. Turnipseed S.B., Roybal J.E., Pfenning A.P., et al. LC/MS confirmation of ionophores in animal feeds. *J. AOAC Int.* 2001 84 (3), 640–647.

20. Huang M., Rumbelha W.K., Emmett W., et al. Rapid and reliable identification of ionophore antibiotics in feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011 23 (2), 358–363.

21. Delahaut P., Pierret G., Ralet N., et al. Multi-residue method for detecting coccidiostats at carryover level in feed by HPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam. - Chem. A.* 2010 27 (6), 801–809.

22. Kennedy D.G., Hughes P.J., Blanchflower W.J. Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. *Food Addit. Contam.* 1998 159 (5), 535–541.

23. Rokka M., Eerola S., Perttilä U., et al. The residue levels of narasin in eggs of laying hens fed with unmedicated and medicated feed. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005 49 (1), 38–42.

24. Commission Directive 2009/8/EC amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in non-target feed. *OJEU.* 2009 40, 19–25.

25. Order of the Ministry of Agrarian Policy and Food of Ukraine № 131 of March 19, 2012. «On approval of the List of maximum permissible levels of undesirable substances in feed and feed materials for animals» (in Ukrainian).

26. 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.

27. ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison, 2015.