

УДК 619:614.31:637:615.33

НОВОЖИЦЬКА Ю.М., канд. вет. наук

ІВАНОВА О.В., канд. вет. наук

ДОБРОЖАН Ю.В., аспірант

*Державний науково-дослідний інститут лабораторної
діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи*

ОЦІНКА ПРИДАТНОСТІ ПІДТВЕРДЖУЮЧИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ У ПРОДУКТАХ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Процедура, описана в статті, встановлює правила оцінки придатності (перевірки) аналітичних методів, що застосовуються за тестування офіційних зразків; уточнюються загальні критерії щодо роз'яснення результатів аналізів проведеної офіційної перевірки таких зразків державними лабораторіями на прикладі хлорамфеніколу та тетрацикліну в м'язовій тканині тварин. Стандартні правила розповсюджуються на всі методи дослідження, що проводяться в Державних лабораторіях ветеринарної медицини згідно з Директивою 96/23/ЄС щодо застосування аналітичних методів і роз'яснення результатів, та вимогами, викладеними в Рішенні Комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року.

Ключові слова: залишкові кількості ветеринарних препаратів, антибіотики, хлорамфенікол, тетрациклін, метод рідинної хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора, оцінювання придатності методу.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Антибіотики широко використовують у тваринництві для лікування сільськогосподарських тварин, птиці та бджіл. Окрім того, антибіотики застосовують як стимулятори росту окремих сільськогосподарських тварин і птиці. Навіть невеликі їх кількості забезпечують значне скорочення відходу молодняку, прискорений ріст та розвиток тварин, що, в свою чергу, дає можливість зменшити витрати кормів на 5–10 %. Лабораторні дослідження показують, що залишкові кількості ветеринарних препаратів виявляються в нирках, печінці, м'язах, молоці та яйцях. Тому відгодівельних тварин, яким використовували антибіотики як з лікувальною, так і профілактичною метою, необхідно витримувати певний час перед забоєм до повного виведення цих препаратів з організму.

Найширше використовують у ветеринарії препарати тетрациклінової та сульфаніламідної груп, а також хлорамфенікол (левоміцетин). Зазначені препарати мають широкий спектр дії і їх часто використовують для лікування тварин за уражень шкіри, хвороб органів дихання, апарату травлення і органів сечостатевої системи, збудниками яких є мікроорганізми.

Для визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів використовують різні методи, але найчутливішим та селективним є метод, що базується на рідинній хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС) [1, 2]. Для отримання вірогідних результатів необхідно провести оцінку придатності методу [3, 4].

Мета роботи – систематизувати процедуру оцінки придатності підтверджуючих методів з визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів для речовин дозволених та заборононених, і порівняння отриманих результатів.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проведені на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Матеріалом для дослідження слугували продукти тваринного походження – м'язи тіла великої рогатої худоби (ВРХ), свиней та птиці. Визначення тетрацикліну проводили згідно з методичними вказівками «Визначення антибіотиків у продукції тваринного походження за допомогою рідинного хроматомас-спектрометра», хлорамфеніколу – «Визначення хлорамфеніколу в необроблених харчових продуктах тваринного походження за допомогою рідинного хроматомас-спектрометра». Аналізи виконували на рідинному хроматографі з мас-спектрометричним детектором *Waters*. Як контроль використовували сертифіковані стандарти тетрацикліну та хлорамфеніколу. Оцінювання придатності методу проводили відповідно до Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року, що забезпечує виконання Директиви Ради 96/23/ЄС стосовно ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів.

Результати дослідження та їх обговорення. Розглядаючи питання оцінювання придатності методів, важливо визначити основні поняття та терміни, які в подальшому характеризуватимуть процес оцінювання методу.

Оцінювання придатності методу – демонстрація того, що аналітичний метод відповідає певним показникам якості. Це процес підтвердження придатності методу відповідним завданням, тобто рішенням специфічної аналітичної проблеми.

Підтверджуючий метод – метод, який надає повну або додаткову інформацію, що дозволяє недвозначно визначити речовину, а за необхідності з'ясувати її кількість на рівні зацікавленості.

Основними характеристиками оцінювання придатності підтверджуючих методів, згідно з Рішенням Комісії 2002/657/ЕС від 12 серпня 2002 року [3, 4], є: межа кількісного визначення (ССа), межа виявлення (ССв), точність, повторюваність, відтворюваність, специфічність.

Перед застосуванням методу в лабораторії необхідно провести додаткову попередню роботу з підготовки зразків різних матриць за умови, що новий метод ефективний з точки зору часу та фінансів. З цією метою проводяться наступні дії: перевірка можливості перерви в роботі на ніч та проведення подальших досліджень наступного дня, необхідність застосування знежирення та його вплив на вихід, тестування очисних колонок різних марок та виробників, перевірка чутливості аналізу до випаровування досуха, зміни температури випаровування, перевірка використання для випаровування повітря чи азоту, можливість використання різних швидкостей центрифугування чи просто фільтрації, тестування аналітичних колонок різних виробників та аналітичних систем. У звіті про оцінювання придатності методу необхідно вказати переваги вибраних компонентів нового аналітичного методу.

Для аналітів без МДР необхідно проаналізувати зразки з додаванням стандартного зразка на рівні $MRPL$, $1,5 MRPL$ та $2 MRPL$, з МДР – на рівні $0,5 MDR$, $1 MDR$ та $1,5 MDR$ по 6 паралелей у кожній серії.

За результатами дослідження вираховуємо: CC_{α} – межа кількісного визначення – означає ту межу, вище якої можна прийти до висновку з ймовірністю помилки α , що зразок є невідповідним; CC_{β} – межа виявлення – означає найменший уміст речовини, що може бути виявлено, визначено і/або кількісно виміряно у зразку з ймовірністю помилки β ; *повторюваність* – це характеристика результатів вимірювань, що відображає близькість один до одного результатів повторних спостережень, проведених за ідентичних умов; r – мірою розсіювання вибірки даних навколо центрального значення (r); *відтворюваність* – це характеристика якості результатів вимірювань, що відображає близькість один до одного результатів повторних спостережень, проведених за різних умов (R); *точність* – як процент повернення; *специфічність* – характеризує здатність методу недвозначно визначити компонент за наявності інших компонентів. Специфічність методу вираховують за відносним часом утримання (RRT), використання як зовнішнього, так і внутрішнього стандартів.

Для аналізу методом рідинної хроматографії (PX) максимальне відхилення RRT становить 2,5 % від еквівалентного стандарту [3, 4]. Співвідношення материнських та дочерних іонів, що враховується, повинно мати сигнал більше 3 відповідно до шуму, між дочерніми іонами має бути в межах параметрів, вказаних у Директиві 2002/657/ЕС [4]. Відтворюваність та повторюваність, що виражаються як лабораторний коефіцієнт варіації (CV), не мають перевищувати рівня, обчисленого за рівнянням Хортвіца [3, 4, 6]:

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

де C – масова частка, виражена як сила (показник) з 10 (наприклад: $1,0 \text{ мг/г} = 10^{-3}$) (табл. 1).

Кожне оцінювання придатності методу може охоплювати усі типи матриці. На прикладі розберемо оцінювання придатності підтверджуючого методу з визначення хлорамфеніколу, тобто речовини, що не має МДР, та тетрацикліну, регламентованого на рівні 100 мкг/кг у м'язах тварин.

Попередньо були відібрані зразки м'язової тканини великої рогатої худоби, свиней і птиці та збагачені хлорамфеніколом, як зазначалося вище, на рівні $MRPL$, що дорівнює $0,3 \text{ мкг/кг}$, $1,5 MRPL$ – $0,45$ та $2 MRPL$ – $0,6 \text{ мкг/кг}$. Для проведення оцінювання придатності методу визначення тетрацикліну окремо були відібрані м'язи BPX , свиней та птиці, збагачені ним на рівнях: $0,5 MDR$, тобто 50 мкг/кг , $1 MDR$ – 100 та $1,5 MDR$ – 150 мкг/кг . Дослідження проведені згідно з процедурами випробування [1, 2].

Таблиця 1 – Приклади на відтворюваність CV для кількісного методу аналізу масових часток

Масова частка	Відтворюваність CV, у проц.
< 1 мкг/кг	*
1–10 мкг/кг	32
10–100 мкг/кг	23
100–1000 мкг/кг (1 мг/кг)	16

(*) Для масових часток, менших за 100 мг/кг, застосування рівняння Хортвіца дає недопустимо високі значення, тому CV для концентрацій менших, ніж 100 мг/кг, будуть якнайменшими.

У таблиці 2 наведені результати, отримані під час проведення оцінювання придатності методу з визначення хлорамфеніколу у зразках м'язової тканини великої рогатої худоби, свиней і птиці, досліджені в різні дні та різними операторами на 3-х рівнях концентрацій. Як видно з даних таблиці 2, внутрішньолабораторна відтворюваність та повторюваність у вигляді коефіцієнта варіації задовольняє вимоги Директиви 2002/657/ЕС [4], де вказано, що цей коефіцієнт не має перевищувати 32 % для концентрацій нижче 1 мкг/кг.

Таблиця 2 – Дані щодо оцінювання придатності методу з визначення хлорамфеніколу в м'язах тварин

0,30 мкг/кг			0,45 мкг/кг			0,60 мкг/кг		
серія 1	серія 2	серія 3	серія 1	серія 2	серія 3	серія 1	серія 2	серія 3
0,323	0,335	0,290	0,448	0,450	0,458	0,606	0,601	0,612
0,290	0,292	0,366	0,455	0,446	0,451	0,617	0,610	0,620
0,347	0,323	0,313	0,440	0,425	0,454	0,601	0,622	0,603
0,328	0,278	0,258	0,449	0,460	0,454	0,616	0,609	0,617
0,264	0,281	0,271	0,451	0,446	0,460	0,624	0,619	0,608
0,313	0,259	0,257	0,457	0,479	0,455	0,609	0,604	0,612
Внутрішньолабораторна відтворюваність та повторюваність (CV, %)								
11,3			2,4			1,2		
Повернення, у процентах								
99,8			100,5			101,9		
CCa								
0,1			0,1			0,1		

Відсоток повернення методу також задовольняє вимоги вказаного вище документа і знаходиться в межах 50–120 % для концентрацій нижче 1,0 мкг/кг. Під час підрахунку *CCa* використовували процедуру калібрувального графіка згідно з *ISO 11843*. Після ідентифікації (виявлення) був накреслений план сигналу щодо доданої концентрації. Відповідна концентрація в у-пересіканні плюс 2,33 рази стандартного відхилення внутрішньолабораторної відтворюваності на нижньому рівні досліджень у пересіканні дорівнює *CCa* [3–5].

У таблиці 3 наведені результати, отримані під час проведення оцінювання придатності методу з визначення тетрацикліну в зразках м'язової тканини від великої рогатої худоби, свиней та птиці, досліджені в різні дні та різними операторами на трьох рівнях концентрацій. Внутрішньолабораторна відтворюваність та повторюваність у вигляді коефіцієнта варіації відповідає вимогам Директиви 2002/657/ЕС [4], де вказано, що цей коефіцієнт не має перевищувати 23 % для концентрацій на рівні 100 мкг/кг.

Відсоток повернення цього методу знаходиться в межах 80–110 % для концентрації вище 10 мкг/кг, що задовольняє вимоги вказаної вище Директиви. В даному випадку *CCa* встановлювалася також за допомогою процедури калібрувального графіка згідно з *ISO 11843*. Після ідентифікації (виявлення) був накреслений план сигналу щодо доданої концентрації. Відповідна концентрація в у-пересіканні плюс 1,64 рази стандартного відхилення внутрішньолабораторної відтворюваності на рівні МДР у пересіканні дорівнює *CCa* [3–5].

Таблиця 3 – Результати оцінювання придатності методу з визначення тетрацикліну у м'язах тварин

50 мкг/кг			100 мкг/кг			150 мкг/кг		
серія 1	серія 2	серія 3	серія 1	серія 2	серія 3	серія 1	серія 2	серія 3
53,04	49,26	58,79	104,48	102,36	104,64	151,14	146,00	152,38
47,96	49,53	56,17	116,51	103,48	103,16	153,85	158,40	157,55
47,84	42,75	57,96	104,38	101,70	89,36	146,53	152,43	155,53
47,92	49,88	56,17	102,03	100,53	110,90	133,54	143,33	155,90
48,47	46,22	58,28	104,24	97,44	101,20	151,58	134,58	156,30
60,61	46,80	56,33	99,28	110,17	104,76	158,36	156,12	153,37
Внутрішньолабораторна відтворюваність (CV, %)								
11,4			5,7			5		
Повторюваність (CV, %)								
6,6			5,7			4,8		
% повернення								
103,8			103,1			100,6		
ССа								
109,6			109,6			109,6		

Після проведення оцінювання придатності методу необхідно оформити звітність, де обов'язково вказують назву документа, на основі якого зроблено оцінювання придатності методу (2002/657/EC, SANCO/10684/2009 або інші). Звіт повинен мати інформацію про аналітичну систему, процедуру пробопідготовки та виконання валідації. Всі розрахунки необхідно додати та, за необхідності, викласти у додатках.

Висновки. 1. Систематизована процедура оцінювання придатності підтверджуючих методів з визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів як для дозволених, так і заборонених речовин.

2. Проведено оцінювання придатності методів з визначення тетрацикліну і хлорамфеніколу, встановлені параметри хроматографування та визначено характеристики придатності методів.

3. Методи з визначення антибіотиків тетрацикліну та хлорамфеніколу, згідно з отриманими даними, є чутливими та специфічними і відповідають вимогам європейської Директиви 2002/657/EC.

4. На підставі експериментальних даних встановлено, що методика визначення залишкових кількостей тетрацикліну та хлорамфеніколу методом РХ/МС/МС є придатною для дослідження продуктів тваринного походження і може успішно використовуватися державними лабораторіями ветеринарної медицини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення антибіотиків у продукції тваринного походження за допомогою рідинного хроматомас-спектрометра / [Новожицька Ю.М., Іванова О.В., Ступак О.М. та ін.]. – К.: ДНДІЛДВСЕ, 2014. – 12 с.
2. Визначення хлорамфеніколу в необроблених харчових продуктах тваринного походження за допомогою рідинного хроматомас-спектрометра / [Абрамов А.В., Новожицька Ю.М., Іванова О.В. та ін.]. – К.: ДНДІЛДВСЕ, 2008. – 13 с.
3. Методичні рекомендації з валідації скринінгових та підтверджуючих методів визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів методом газової та рідинної хроматографії / [Новожицька Ю.М., Іванова О.В., Бондарець О.В. та ін.]. – К.: ДНДІЛДВСЕ, 2013. – 33 с.
4. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Result, European Commission, Brussels.
5. ISO 11843: 1997 Capability of detection - Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case.
6. Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies / [Horwitz W., Pellerin F., Svehla G. et al.]. – Pure & Appl Chem, 1995.– Vol. 67. – P. 331-43.

REFERENCES

1. Vyznachennja antybiotyktiv u produkcii' tvarynnogo pohodzhennja za dopomogoju ridynnogo hromatomas-spektrometra / [Ju. M. Novozhyc'ka, O. V. Ivanova, O. M. Stupak ta in.]. – K., DNDILDVSE, 2014. – 12 s.
2. Vyznachennja hloramfenikolu v neobroblenyh harchovyh produktah tvarynnogo pohodzhennja za dopomogoju ridynnogo hromatomas-spektrometra / [A.V. Abramov, Ju. M. Novozhyc'ka, O.V. Ivanova, O.M. Stupak ta in.].– K.: DNDILDVSE, 2008. – 13 s.

3. Metodychni rekomendacii' z validacii' skryningovyh ta pidtverdzhujuchyh metodiv vyznachennja zalyshkovyh kil'kostej veterynarnyh preparativ metodom gazovoi' ta ridynnoi' hromatografii' / [Ju.M. Novozhyts'ka, O.V. Ivanova, O.V. Bondarec' ta in.]. – K: DNDILDVSE, 2013. – 33 s.
4. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Reformation of Analytical Methods and the Interpretation of Result, European Commission, Brussels.
5. ISO 11843: 1997 Capability of detection - Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case.
6. Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies / [Horwitz W., Pellerin F., Svehla G. et al.]. – Pure & Appl Chem, 1995.– Vol. 67. – P. 331-43.

Оценка пригодности подтверждающих методов для определения остаточных количеств ветеринарных препаратов в продуктах животного происхождения

Ю.Н. Новожицкая, Е. В. Иванова, Ю.В. Доброжан

Процедура которая описана в статье устанавливает правила оценки пригодности (проверки) аналитических методов, применяемых при проведении тестирований официальных образцов, а также уточняются общие критерии по разъяснению результатов анализов при проведении официальной проверки таких образцов лабораториями на примере хлорамфеникола и тетрациклина в мышечной ткани животных. Стандартные правила распространяются на все методы исследования проводимые в государственных лабораториях ветеринарной медицины, согласно Директивы 96/23/EC по применению аналитических методов и разъяснения результатов и требованиями изложенными в Решении комиссия 2002/657/EC от 12 августа 2002 года.

Ключевые слова: остаточные количества ветеринарных препаратов, антибиотики, хлорамфеникол, тетрациклин, метод жидкостной хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора, оценка пригодности метода.

Validation of methods of determination residual veterinary of drugs in products of animal origin

J. Novozhytska, O. Ivanova, J. Dobrogan

The most used drugs in veterinary practice tetracycline and sulfanilamide group and the antibiotic chloramphenicol. These drugs have a big spectrum of activity and is often used for skin infections, infections of respiratory tract, gastrointestinal and genitourinary diseases. For determination the residual of veterinary drugs use different methods, but the most sensitive and selective method is based on liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC/MS/MS). For exactly results is necessary make validation of the methods.

The goal of our work is systematisation the procedure validation of confirmation methods determination residual of veterinary drugs for permitted and prohibited substances and comparing received results.

The study was conducted at the Research Chemical and Toxicological Department of the State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise (SRILDVSE). To determine the tetracycline used guidelines on "Determination of antibiotics in animal products using liquid chromatomas-spectrometer", and "Determination of chloramphenicol in foods of animal origin using liquid chromatomas- spectrometer". Products of the animal origin - the muscles of poultry and pig and cow were used for the study. Validation was performed according the European Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, which provides implementation of Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

The main characteristics of supporting life evaluation methods include: quantitative decision limit (CCa), detection capability (CCb), accuracy, repeatability, reproducibility, specificity by Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Before applying the method in the laboratory should be made extra work, to prepare samples of different matrices and prove that new method there is high effective in terms of time and finance.

Previously were sampled muscle tissue of cattle, pigs and poultry, and was added chloramphenicol, with levels MRPL, it is 0.3 mg / kg, 1.5 MRPL, 0.45 mg / kg and 2 MRPL, 0.6 mg / kg. Separately were selected muscles of cattle, pigs and poultry for determination of tetracycline, and like in first variant were added tetracycline with level 0.5 MRL or 50 mg / kg MRL or 100 mg / kg and 1.5 MRL or 150 mg / kg. After research according to test procedures we had results, which are chloramphenicol CCa 0.1, recovery 99.8 %, repeatability and reproducibility (CV%) 2.4. Results of tetracycline are CCa 109.6, recovery 103 %, repeatability and reproducibility (CV%) 5.7.

As we can see reproducibility and repeatability for chloramphenicol are satisfying the requirements of Directive 2002/657 / EC, indicating that this ratio must not be above 32% for concentration less than 1 mg / kg. This method also satisfies the recovery requirements of the above-mentioned document and included in the limit 50% - 120% for concentrations less than 1 mg / kg. CCa was counting by calibration curve procedure according to ISO 11843. The corresponding concentration at the y-intercept plus 2.33 times the standard deviation of the reproducibility of the intercept equals the decision limit for prohibited substances. About of tetracycline, we have results satisfying the requirements of Directive 2002/657 / EC too, indicating that this ratio must not be above 23% for concentration less than 100 mg / kg. This method also satisfies the recovery requirements of the above-mentioned document and included in the limit 80% - 110 % for concentrations less than 100 mg / kg. CCa was counting by calibration curve procedure according to ISO 11843. The corresponding concentration at the y-intercept plus 1.64 times the standard deviation of the reproducibility of the intercept equals the decision limit for allowed substances.

Conclusions and prospects for further research: 1. Was systematic procedure for assessing the suitability of supporting methods to determine residual amounts of veterinary drugs both for permitted and banned substances.

2. The methods of determination antibiotics and chloramphenicol was validated, parameters MS/MS detection and validation was set.

3. These methods of determining antibiotics and chloramphenicol according to the results are sensitive and specific and satisfy all the requirements of European Directive 2002/657 / EC.

4. This method is suitable for the sanitary inspection determination of the products of animal origin and can be used successfully in Veterinary Laboratories.

Надійшла 15.10.2015 р.