

УДК 543.054, 543.635.9

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТКОВ МАРКЕРОВ АВИЛАМИЦИНА И НОЗИГЕПТИДА В КУРИНОМ МЯСЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

© 2025 г. Д. П. Булкатов^{a, b}, А. О. Мелехин^{a, *}, М. Ю. Парфенов^c,
В. В. Тищенко^a, А. Л. Баиров^a

^aФедеральный центр охраны здоровья животных
мкр. Юрьево, Владимир, 6009101 Россия

^bМосковский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана,
Центр НТИ “Цифровое материаловедение: новые материалы и вещества”
2-я Бауманская ул., 5, с. 1, Москва, 105005 Россия

^cBaltic Control

Астана, 010000 Казахстан

*E-mail: artem150196@mail.ru

Поступила в редакцию 27.09.2024 г.

После доработки 12.10.2024 г.

Принята к публикации 14.10.2024 г.

Многокомпонентный анализ на остаточное содержание ветеринарных препаратов методом ВЭЖХ-МС/МС актуален для обеспечения безопасности пищевых продуктов. Значительную проблему представляет определение ветеринарных препаратов, молекулы которых имеют большие размеры. Электрораспылительная ионизация таких молекул затруднена, а достичь требуемой чувствительности путем классического выделения из матрицы с последующим детектированием сложно. К таким препаратам можно отнести авиламицин и нозигептид. Для решения данной проблемы возможна фрагментация молекул на более мелкие и легко обнаруживаемые остатки с помощью гидролиза, что в свою очередь ставит задачу оптимизации условий такой подготовки, а также оценки уникальности выбранного маркера. Показана возможность одновременного определения авиламицина и нозигептида в курином мясе путем их щелочного гидролиза до маркеров — дихлоризоверниновой кислоты и 4-гидроксиметил-3-метилен-2-карбоновой кислоты соответственно. Изучены условия экстракции, гидролиза и методы дальнейшей очистки. При выбранных условиях извлечение аналитов составило >85%, кроме того, достигнута удовлетворительная воспроизводимость ($s_r \leq 0.15$). Пределы обнаружения составили 5 мкг/кг. Разработанная методика является высокоселективной, экспрессной, простой в исполнении, недорогой и обладает хорошими аналитическими характеристиками.

Ключевые слова: мясо курицы, авиламицин, нозигептид, ВЭЖХ-МС/МС.

DOI: 10.31857/S0044450225020068 **EDN:** adyobjb

Антибиотики применяют не только для профилактики инфекционных бактериальных заболеваний, но и как стимуляторы роста; их субтерапевтические дозы при сбалансированном питании стимулируют скорость роста здоровых цыплят [1–3]. Авиламицин и нозигептид (схема 1) относятся к числу пептидных антибиотиков, широко используемых при выращивании птицы для борьбы как с патогенной, так и с естественной микрофлорой кишечника [4, 5]. Продукты птицеводства (мясо,

яйца), загрязненные остатками антибиотиков, являются одной из основных причин развития устойчивости к противомикробным препаратам и представляют серьезную угрозу для общественного здоровья во всем мире [6, 7]. Для контроля безопасности пищевых продуктов необходимо совершенствовать методы определения антибиотиков.

Известны способы определения остатков нозигептида и авиламицина методом иммуноферментного анализа (ИФА) [8]. Метод ИФА,

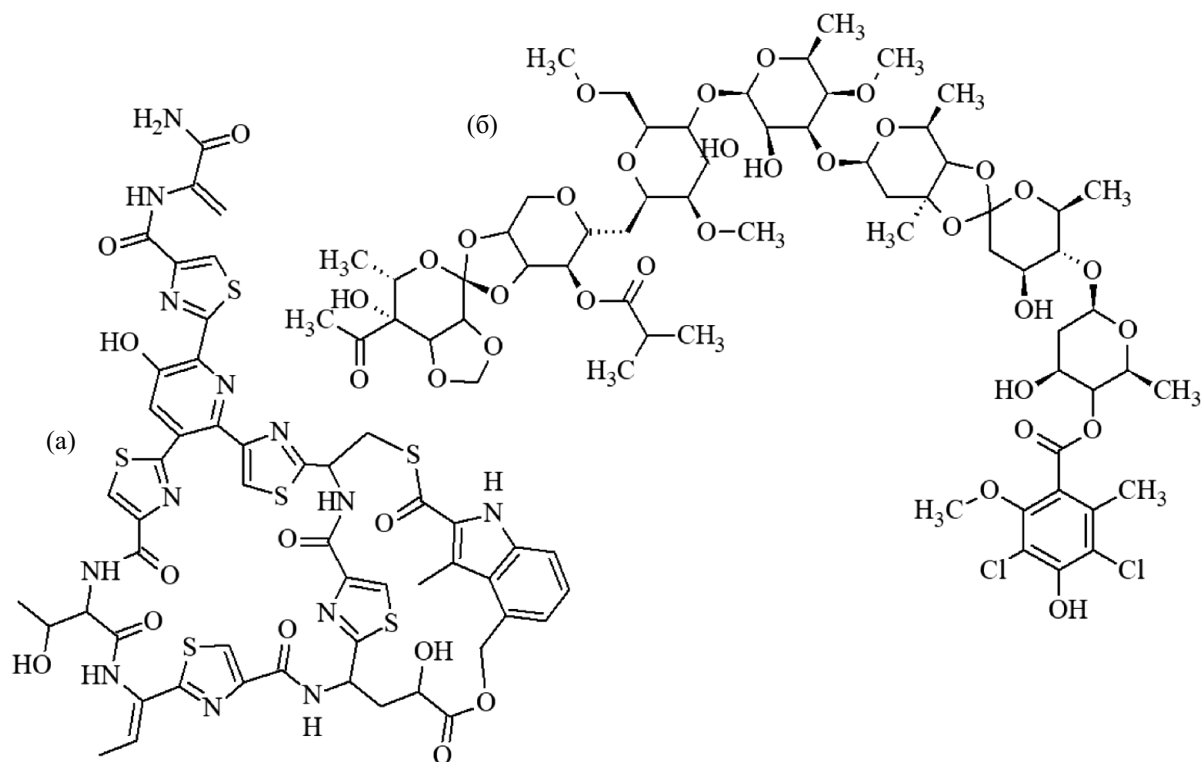


Схема 1. Структурные формулы (а) нозигептида и (б) авиламицина.

однако, имеет недостатки, связанные с перекрестной чувствительностью к структурно схожим соединениям, что приводит к ложноположительным результатам. Это может затруднить анализ сложных матриц, где присутствует несколько веществ [9]. В свою очередь, любые положительные результаты ИФА требуют проведения подтверждающих испытаний и, следовательно, дополнительных расходов [10].

Описано применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) для определения остатков препаратов [11–13]. ВЭЖХ-ФЛД характеризуется удовлетворительной чувствительностью, но не обладает достаточной селективностью из-за сложности матрицы, которая может содержать вещества, мешающие обнаружению целевых соединений на требуемом уровне [14–16].

Наиболее надежным методом определения остатков антибиотиков является жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) благодаря возможности однозначной идентификации и количественного определения [14–21]. В случае метода ВЭЖХ-МС/МС матричный эффект является основной проблемой при определении авиламицина и нозигептида. Кроме того, сигналы иона-продукта и иона-предшественника нозигептида и авиламицина малоинтенсивны [19]. Это связано с тем, что ионизация

этих молекул затруднена. Однако исследования показали, что нозигептид образует несколько крупных ионов-продуктов при высоких энергиях соударения (ЭС) [15, 16]. Преимущество этого подхода заключается в прямом определении нозигептида, однако большинство масс-спектрометров не могут обеспечить такие высокие значения ЭС, что ограничивает воспроизводимость метода. С целью адаптации методики определения под рутинное аналитическое оборудование данные соединения подвергают гидролизу с последующим определением специфического маркера с помощью ВЭЖХ-МС/МС [14, 15]. Для нозигептида маркером является 4-гидроксиметил-3-метилиндол-2-карбоновая кислота (ГМИК), а для авиламицина — дихлоризоэверниновая кислота (ДХИК) (схема 2).

На сегодняшний день опубликовано незначительное число работ, посвященных определению авиламицина и нозигептида в пищевых матрицах, а работы по их одновременному определению отсутствуют. Во многих странах авиламицин и нозигептид активно применяют для лечения сельскохозяйственных животных [22, 23]. Утвержденные максимально допустимые уровни (МДУ) на территории Таможенного союза составляют для авиламицина в виде его маркерного остатка (ДХИК) — 50 мкг/кг, а содержание нозигептида в пищевых продуктах не допускается [24]. В Китайской Народной Республике установлен норматив для авиламицина на уровне 10 мкг/кг

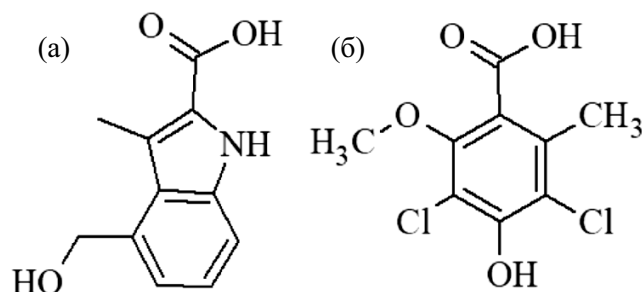


Схема 2. Структурные формулы (а) 4-гидроксиметил-3-метилиндол-2-карбоновой кислота (ГМИК) и (б) дихлоризоверниновой кислоты (ДХИК).

[25]. В Европейском союзе МДУ для авиламицина установлен на уровне 50 мкг/кг [26]. В Республике Корея МДУ для нозигептида и для авиламицина 10 мкг/кг [27]. Из-за необходимости определять низкие концентрации этих веществ в продуктах питания разработка новых методов определения является актуальной задачей.

В данной работе использован метод ВЭЖХ-МС/МС для одновременного определения авиламицина и нозигептида в образцах мяса птицы косвенно по их продуктам гидролиза – ДХИК и ГМИК. Оптимизированы стадии гидролиза и очистки, а также условия проведения ВЭЖХ-МС/МС-анализа. Предложенная процедура очистки обеспечивает эффективное удаление совместно экстрагируемых компонентов матрицы. Изучены полнота извлечения, воспроизводимость, линейность, матричные эффекты, предел количественного определения (c_n), предел обнаружения ($c_{мин}$) и селективность определения авиламицина и нозигептида в образцах куриного мяса. Установлено, что метод эффективен и надежен для одновременного определения остатков авиламицина и нозигептида.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. Для приготовления подвижных фаз использовали ацетонитрил (ACN), муравьиную кислоту, метанол (MeOH) и воду для ВЭЖХ фирмы Fisher Scientific (США). Для подготовки проб использовали ацетон (Химмед, Россия), *n*-гексан (Химмед, Россия), гидроксид натрия (Химмед, Россия) и этилацетат (Sigma Aldrich, США). Воду очищали с использованием системы Milli-Q (Millipore, США).

Все стандарты и внутренние стандарты: авиламицин, нозигептид, 4-гидроксиметил-3-метилиндол-2-карбоновая кислота (ГМИК), дихлоризоверниновая кислота (ДХИК) и дихлоризоверниновая кислота- D_6 (ДХИК- D_6) приобретали у компаний Sigma Aldrich (США), Ehrenstorfer GmbH (Германия), Toronto Research Chemicals

(Канада) и Witega (Германия). Индивидуальные стандартные растворы веществ концентрацией 200 мг/л готовили растворением соединений в метаноле. Для обеспечения полного растворения применяли обработку ультразвуком. Растворы хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более 6 мес. Рабочий раствор смеси авиламицина и нозигептида с концентрацией 2.5 мг/л готовили разбавлением исходных растворов метанолом. Аналогично готовили раствор внутреннего стандарта (ДХИК- D_6) с концентрацией 1 мг/л. Срок годности приготовленных растворов стандартов составлял 1 месяц. Рабочие растворы готовили путем разбавления исходных растворов метанолом в день использования.

Аппаратура. Растворение проводили в ультразвуковой ванне Branson 1510RDTH (Branson Ultrasonics Corp., Швейцария). Пробы перемешивали и центрифугировали с помощью шейкера MultiReax (Heidolph, Германия) и центрифуги SL40R (Thermo Scientific, США). Образцы концентрировали с помощью TurboVapII (Caliper Life Sciences, США) в токе азота. pH растворов контролировали с помощью pH-метра Эксперт 001-иономер (Эконикс-Эксперт, Россия). Использовали жидкостный хроматограф Shimadzu HPLC Nexera X2 (Shimadzu, Япония), оснащенный бинарным насосом и автосамплером. Для разделения аналитов использовали колонку AcclaimTM 120 C18 (2.1×100 мм, 3 мкм) (Thermo Scientific, США). Для детектирования ДХИК и ГМИК использовали тройной квадрупольный масс-спектрометр Shimadzu 8060 (Shimadzu, Япония).

Образцы куриного мяса. Все использованные образцы мяса птицы получали в Федеральном центре охраны здоровья животных (Владимир, Россия) из собственного вивария.

Пробоподготовка. Гомогенизированные образцы мяса курицы (1.00 ± 0.02 г) взвешивали в полипропиленовых центрифужных пробирках емк. 15 мл. Аликвоты по 200 мкл соответствующих рабочих стандартов добавляли для подготовки образцов с концентрациями 5, 10, 25, 50, 100, 500 мкг/кг для градуировки (или 200 мкл метанола для анализируемых образцов). Затем во все образцы и стандарты добавляли порции по 100 мкл рабочего внутреннего стандарта для получения эквивалентной концентрации в образцах мяса курицы. Для экстракции вносили 5 мл ацетона. Полученную смесь тщательно перемешивали на шейкере в течение 20 мин. После этого образцы центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 мин. Органический слой декантировали в новую пробирку. Экстракты упаривали в токе азота высокой чистоты при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ досуха. Для гидролиза вносили по 2.5 мл 1 М раствора NaOH. Полученные смеси тщательно перемешивали на шейкере в течение 10 мин с последующим гидролизом в течение 120 мин при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. После завершения процедуры гидролиза доводили pH до 2.5 путем внесения

1 М H_3PO_4 и проводили жидкостно-жидкостную экстракцию 4 мл этилацетата на шейкере в течение 10 мин. Далее центрифугировали при 4500 об/мин в течение 10 мин. Органический слой переносили в новую пробирку, упаривали в потоке азота высокой чистоты при 40 °С и вновь растворяли путем внесения 1 мл смеси подвижных фаз А и Б (95 : 5). Полученные экстракты обезжиривали путем добавления 4 мл гексана. Образцы перемешивали в течение 10 мин, центрифугировали и удаляли гексановую фракцию. Далее экстракты фильтровали с помощью нейлоновых шприцевых фильтров с диаметром пор 0.22 мкм в вials для хроматографии и использовали для ВЭЖХ-МС/МС-анализа.

ВЭЖХ-МС/МС-анализ. Для хроматографического разделения использовали жидкостный хроматограф Shimadzu HPLC Nexera X2, оснащенный бинарным насосом и автосамплером. Разделение проводили на колонке Acclaim™ 120 C18 (100 × 2.1 мм) с размером зерна адсорбента 3.0 мкм в режиме градиентного элюирования. Во время работы термостат колонки и автосамплер поддерживали температуру 40 и 15 °С соответственно. Разделение проводили с использованием подвижных фаз, состоящих из 0.5 % муравьиной кислоты в воде (элюент А) и муравьиной кислоты в смеси ацетонитрила и метанола (50 : 50, по объему) (элюент Б). Использовали следующую градиентную программу: 0.0–0.5 мин: 5 % Б; 0.5–6.0 мин: увеличение от 5 до 100 % Б; 6.0–8.0 мин: 100 % Б; 8.0–9.0 мин: возврат к 5 % Б; 9.0–10.0 мин: 5 % Б. Скорость потока подвижной фазы – 0.3 мл/мин. Объем вводимого образца – 10 мкл. Трехкварупольный масс-спектрометр LC-MS 8060 Shimadzu был настроен для сбора данных в режиме мониторинга множественных реакций (ММР).

Для анализа подбирали следующие оптимальные параметры электрораспылительной ионизации (ЭРИ) в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов: поток газа распылителя: 3 л/мин, поток газа-осушителя: 10 л/мин, нагревательный газ: 10 л/мин, температура интерфейса: 300 °С, температура линии десольватации: 250 °С. Условия ММР: ЭС сначала оптимизировали для каждого аналита путем введения индивидуальных растворов ДХИК, ГМИК и ДХИК- D_6 , приготовленных в подвижной фазе. Характеристические молекулярные ионы выбирали в качестве ионов-предшественников, для ДХИК и ГМИК контролировали два иона-продукта. Для количественной оценки использовали наиболее интенсивный переход ММР, а также второй переход для подтверждения. Параметры ММР и времена удерживания ДХИК, ГМИК, ДХИК- D_6 представлены в табл. 1. Хроматограммы остатков маркеров после гидролиза ветеринарных препаратов приведены на рис. 1.

Таблица 1. Времена удерживания и параметры ММР-переходов

Вещество	t_R , мин	Q_1 , m/z	Q_3 , m/z	ЭС, эВ
ДХИК	5.68	249.0	190.2/205.0	19/17
ГМИК	5.09	204.1	160.3/142.2	14/20
ДХИК- D_6	5.66	254.8	193.1	20

Хроматограммы обрабатывали с помощью программы LabSolutiom Insight (Shimadzu, Япония). Концентрацию аналита в пробе определяли с помощью градуировочных зависимостей. Аналитическим сигналом служило отношение площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта. Линейность градуировочных графиков оценивали на модельных образцах, не содержащих остаточных количеств определяемых аналитов.

Валидация. Прецизионность разработанного метода оценивали следующим образом. Пределы количественного определения (c_n) и пределы обнаружения ($c_{мин}$) рассчитывали с учетом отношения сигнал/шум 3 и 10 соответственно. Для определения внутрисуточной и междусуточной повторяемости готовили образцы куриного мяса с добавками авиламицина и нозигептида 5, 10 и 500 мкг/кг, каждую из них повторяли по 5 и 15 раз. Изучали матричные эффекты, для этого сравнивали наклоны градуировочных зависимостей с добавлением матрицы и без нее. Количественные оценки проводили с использованием шестиуровневой градуировочной зависимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация экстракции. Изучили влияние pH в диапазоне от 1 до 13 на экстракцию ДХИК, ГМИК этилацетатом (рис. 2). Количественную экстракцию наблюдали в кислой области, в диапазоне pH 1–3. При увеличении pH значения степеней извлечения падали до нуля при pH 6 и 7 для ГМИК и ДХИК соответственно. Это связано с наличием в их составе карбоксильных групп (схема 2), которые протонируются в кислой среде, что дает возможность экстрагировать их органическими растворителями. В дальнейших экспериментах экстракцию проводили при pH 2.5.

Оптимизация гидролиза. На первом этапе оценивали влияние концентрации щелочи на кинетику реакции гидролиза при 80 °С (рис. 3). Для нозигептида наблюдали быструю конверсию в ГМИК, во всех вариантах реакция завершалась за 10 мин, а концентрация аддукта не менялась в течение последующих 4 ч (на рис. 3а показан начальный участок кривой).

Гидролиз авиламицина с образованием ДХИК происходил значительно дольше, чем

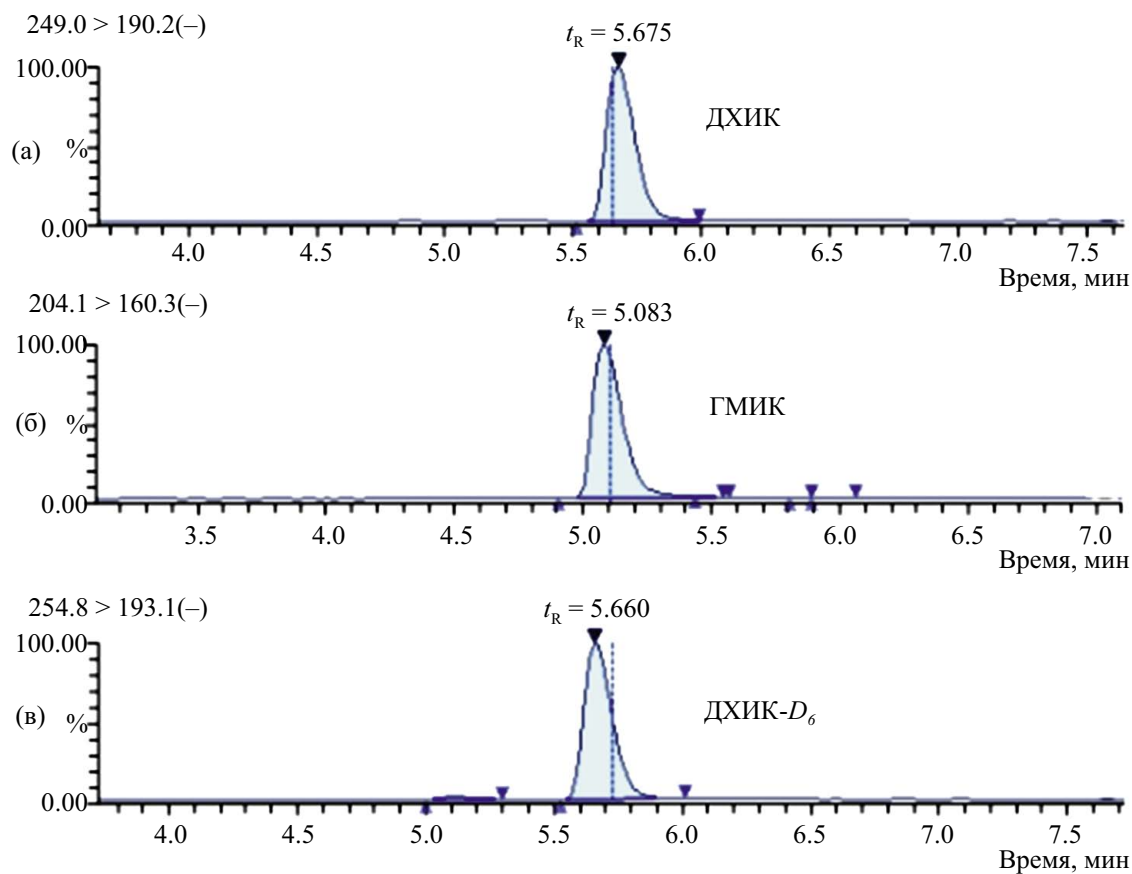


Рис. 1. Хроматограммы экстракта куриного мяса после гидролиза с добавлением (а) 100 мкг/кг авиламицина, (б) 100 мкг/кг нозигептида и (в) внутреннего стандарта ДХИК- D_6 .

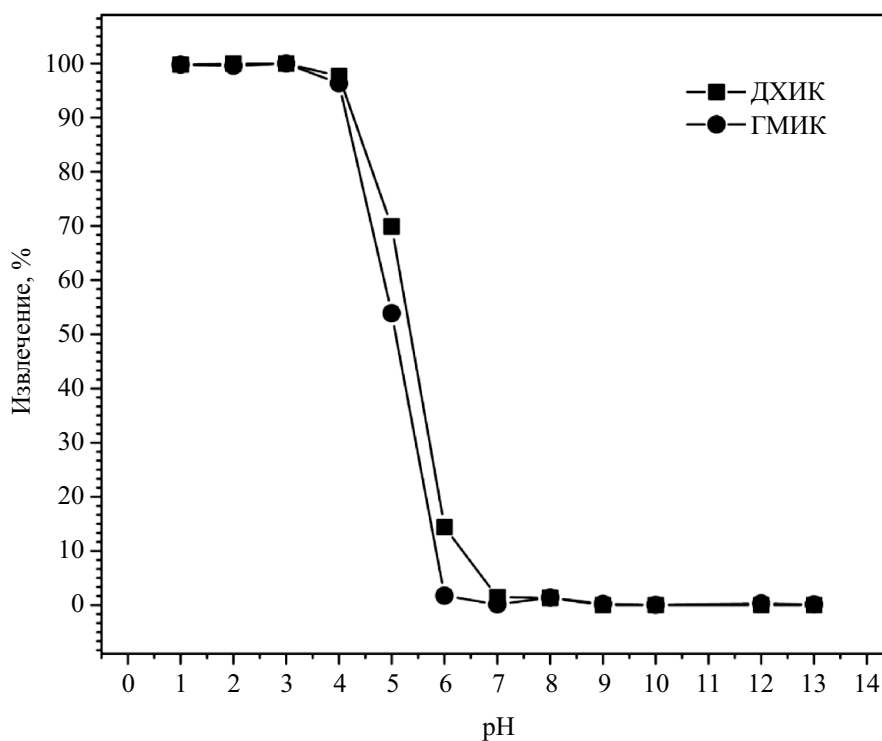


Рис. 2. Влияние pH на экстракцию ГМИК и ДХИК.

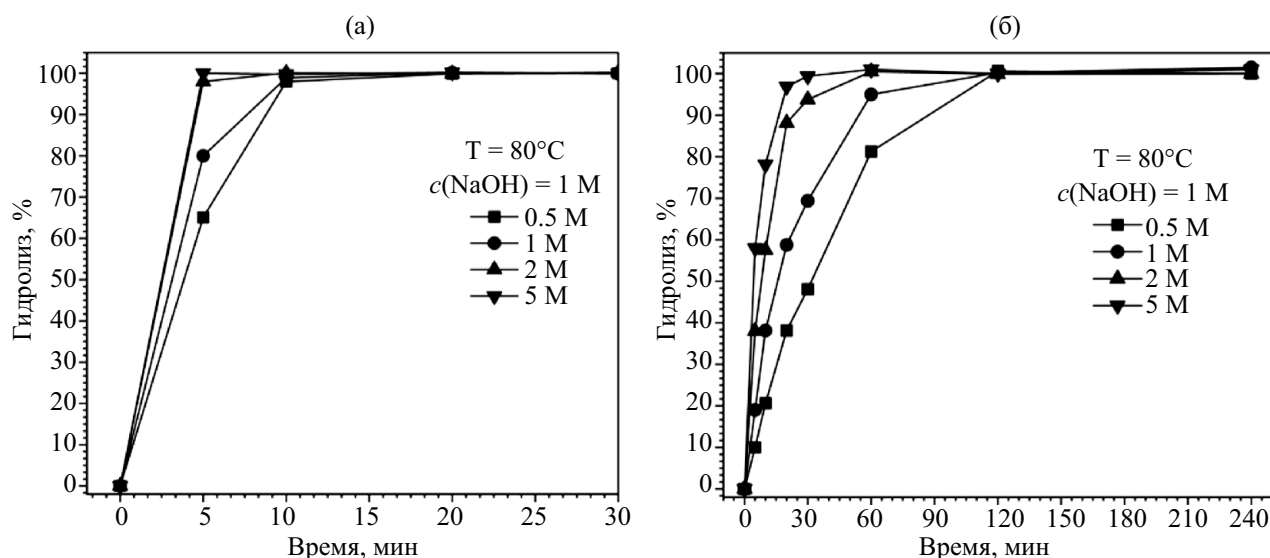


Рис. 3. Влияние концентрации раствора гидроксида натрия на гидролиз (а) нозигептида и (б) авиламицина (80 °C).

нозигептида, и завершался за 2 ч при концентрации щелочи 0.5 и 1 М, за 1 ч – 2 М и 0.5 ч – 5 М (рис. 3б).

В присутствии матрицы гидролизованный раствор при концентрации раствора NaOH выше 1 М после промывки этилацетатом образовывал устойчивую эмульсию, что затрудняло перенос органического слоя в новые пробирки для дальнейшей пробоподготовки. Несмотря на то, что гидролиз занимает меньше времени при более высоких концентрациях щелочи, для дальнейшей оптимизации выбрали концентрацию раствора NaOH 1 М.

Аналогично проводили гидролиз образцов при разных температурах (рис. 4). Нозигептид почти полностью гидролизировался с образованием ГМИК

за 10 мин при 80 °C, 20 мин при 60 °C и 30 мин при 40 °C (рис. 4а). Гидролиз авиламицина проходит за 120 мин при 80 °C, 180 мин при 60 °C и 240 мин при 40 °C (рис. 4б). Полученные результаты указывают на возможность одновременного гидролиза двух пептидных антибиотиков нозигептида и авиламицина. Несмотря на разную скорость реакции образования маркерных остатков ДХИК и ГМИК, превышение времени не влияет на концентрацию ГМИК, который быстро образуется в течение 10 мин. В качестве оптимальных условий для обоих веществ выбрали следующие: 80 °C и 1 М раствор NaOH в течение 2 ч.

Валидация. Метрологические характеристики методики представлены в табл. 2.

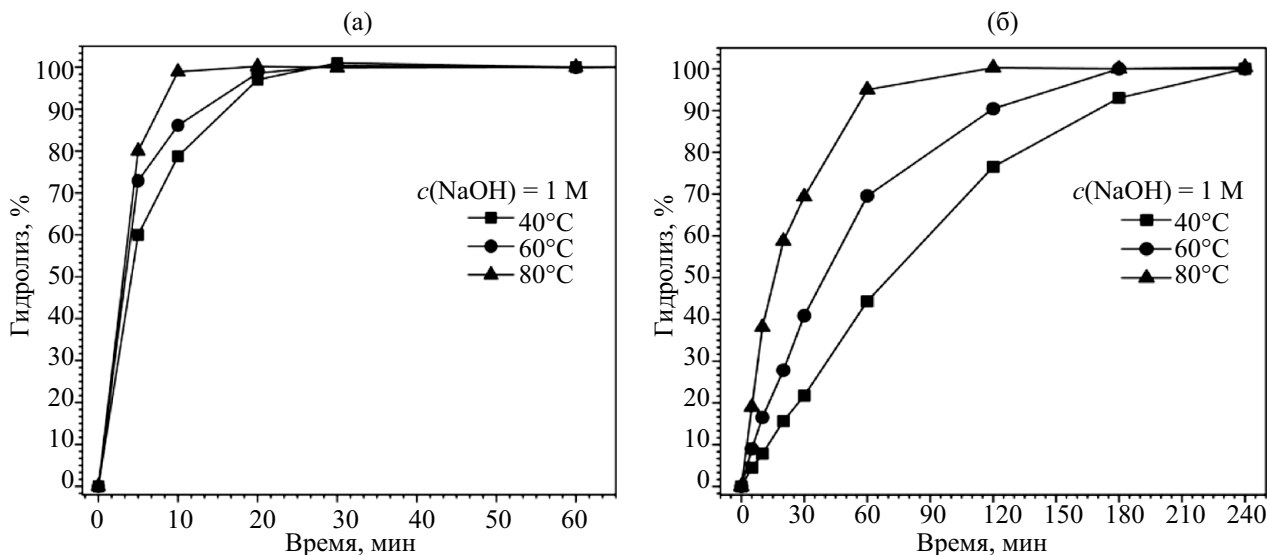


Рис. 4. Влияние температуры на гидролиз (а) нозигептида и (б) авиламицина ($c_{\text{NaOH}} = 1 \text{ М}$).

Таблица 2. Основные валидационные параметры разработанной ВЭЖХ-МС/МС-методики

Вещество	R^2	Содержание, мкг/кг	Степень выделения, %	Повторяемость (s , $n = 5$)	Внутрилабораторная прецизионность (s , $n = 15$)	c_n мкг/кг	$c_{мин}$ мкг/кг	МЭ*, %
Авиламицин	0.998	5/10/500	97/100/99	0.10/0.15/0.05	0.11/0.12/0.06	5	2	93
Нозигептид	0.999	5/10/500	96/100/98	0.09/0.12/0.04	0.10/0.12/0.05	5	2	94

*МЭ – матричный эффект.

Установлена линейная корреляция в пределах 5–500 мкг/кг для авиламицина и нозигептида. Коэффициенты корреляции градуировочных зависимостей концентрации от площади хроматографических пиков в анализируемых образцах составили не менее 0.99. Степень извлечения составила более 95% на трех уровнях концентрациях, что свидетельствует о эффективном выборе метода экстракции и очистки проб. Предел количественного определения (c_n) и предел обнаружения ($c_{мин}$) составили 5 и 2 мкг/кг соответственно, что указывает на достаточно высокую чувствительность и позволяет определять содержание аналитов на уровне ниже МДУ. Относительное стандартное отклонение для аналитов составило <15%, что подтверждает приемлемую воспроизводимость и повторяемость. Матричные эффекты составили 93 и 94% для авиламицина и нозигептида соответственно, что свидетельствует о хорошей очистке образцов от мешающего влияния матрицы.

* * *

Показана возможность одновременного определения авиламицина и нозигептида по их маркерным остаткам ДХИК и ГМИК соответственно, полученным щелочным гидролизом исходных целевых соединений. Методика, опробованная на образцах куриного мяса, показала хорошую точность, низкое влияние матрицы и высокий процент извлечения. Диапазон определяемых содержаний по предлагаемой методике составил 5–500 мкг/кг для авиламицина и нозигептида, что позволяет определять аналиты на уровне, обеспечивающем соблюдение МДУ остатков. Предлагаемый метод ВЭЖХ-МС/МС является хорошей альтернативой методам, основанным на определении исходных соединений с использованием высоких энергий удара (100–120 эВ).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств федерального бюджета в рамках НИР “Разработка комплекса методик для определения

остаточного количества ветеринарных препаратов методом жидкостной хроматографии с масс-детектором”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Для реализации эксперимента на птице в условиях лабораторного вивария были использованы отдельные клетки, в которых создавались условия, идентичные условиям для промышленного выращивания (постоянный доступ к чистой воде через nipple-поилки, кормление по графику, в том числе зеленой травой).

В связи с тем, что эксперимент невозможен без участия животных, количество цыплят для эксперимента было минимальным, цыплята не испытывали неудобств во время опыта, а убой проводился путем передозировки анестетика (диэтиловый эфир), комиссия по биоэтике ВНИИЗЖ выдала разрешение выполнить эту работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li J., Zhou Y., Yang D., Zhang S., Sun Z., Wang Y. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* in chickens and pigs from Beijing and Shanxi // *Vet. Microbiol.* 2021. V. 252. Article 108932. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108932>
- Miyakawa M., Casanova N., Kogut M. How did antibiotic growth promoters increase growth and feed efficiency in poultry? // *Poult. Sci.* 2024. V. 103. Article 103278. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103278>
- Polikanov Y., Aleksashin N., Beckert B., Wilson D. The mechanisms of action of ribosome-targeting peptide antibiotics, *frontiers in molecular biosciences* // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 5. Article 48. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00048>

4. Yang W., Hu C., Wang C., Chou C. Growth performance of broilers raised without HMIs in Taiwan // *J. Chin. Soc. Anim. Sci.* 2021. V. 50. P. 13.
5. Roth N., Käsbohrer A., Mayrhofer S., Zitz U., Hofacre C., Domig. K.J. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview // *Poult. Sci.* 2019. V. 98. P. 1791.
<https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
6. Zhao Q., Jiang Z., Li T., Cheng M., Sun H., Cui M. et al. Current status and trends in antimicrobial use in food animals in China, 2018–2020 // *One Health Adv.* 2023. V. 1. Article 29.
<https://doi.org/10.1186/s44280-023-00029-5>
7. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Холявская Ю.Н., Седых Е.С., Дмитриенко С.Г., Апыри В.В., Байров А.Л. Быстрый гидролиз и дериватизация метаболитов нитрофуранов с новым дериватирующим агентом 5-нитро-2-фуральдегидом при их ВЭЖХ-МС/МС-определении в курином мясе // *Журн. аналит. химии.* 2022. Т. 77. № 10. С. 938. (Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Kholiyavskaya Y.N., Sedykh E.S., Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Bairov A.L. Rapid hydrolysis and derivatization of nitrofuran metabolites with a new derivatizing agent 5-nitro-2-furaldehyde in their determination in chicken meat by HPLC–MS/MS // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. P. 1300.
<https://doi.org/10.1134/S1061934822100112>)
8. Zhou L., Chen G., Chen M., Lu X., Xi Y., Zhi Y. Development of a highly sensitive monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avilamycin in feed // *Food Addit. Contam. Part A.* 2022. V. 39. Article 3.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2021.2017003>
9. Song J.G., Baral K.C., Kim G.L., Park J.W., Seo S.H., Kim D.H. et al. Quantitative analysis of therapeutic proteins in biological fluids: Recent advancement in analytical techniques // *Drug Delivery.* 2023. V. 30. № 1. P. 268.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2023.2183816>
10. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC (Text with EEA relevance).
11. Yamata T., Shimamura C., Asao M., Aita N., Chihara T. Validation study on a method of determination of nosiheptide in formula feeds by HPLC-FL // *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 2015. V. 56. Article 173–7.
<https://doi.org/10.3358/shokueishi.56.173>
12. Song X., Zhang X., Zhang Y., Li M., He X. Rapid determination of nosiheptide in feed based on dispersive SPE coupled with HPLC // *J. Sep. Sci.* 2018. V. 42. Article 3.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201801036>
13. Jiang H., Zhai W., Xia X., Ding S., Xu F., Shen J. et al. LC Determination of nosiheptide in swine kidney and liver // *Chromatographia.* 2010. V. 71. P. 131.
<https://doi.org/10.1365/s10337-009-1418-z>
14. Song X., Xie J., Su Y., Martín-Esteban A., Qiu J., Li X., He L. Analysis of nosiheptide in food animal tissues via its unique degradation product by liquid chromatography–tandem mass spectrometry after alkaline hydrolysis // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. Article 38.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03912>
15. Saito-Shida S., Hayashi T., Nemoto S., Akiyama H. Determination of total avilamycin residues as dichloroisoevernic acid in porcine muscle, fat, and liver by LC-MS/MS // *Food Chem.* 2018. V. 249. P. 84.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.003>
16. Shen J., Zhao F., Zhu P., Wu F., Chen X., Kang H., Yue Z. Direct determination of nosiheptide residue in animal tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2022. V. 1193. Article 123167.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123167>
17. Melekhin A.O., Bulkatov D.P., Parfenov M.Y., Apyari V.V., Tolmacheva V.V. A dual column chromatographic method for simultaneous quantifying aminoglycosides and coccidiostats in milk // *J. Food Compos. Anal.* 2023. V. 121. Article 105369.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105369>
18. Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Goncharov N.O., Apyari V.V., Bulkatov D.P., Parfenov M.Y. et al. Rapid multi-residue LC-MS/MS determination of nitrofuran metabolites, nitroimidazoles, amphenicols, and quinolones in honey with ultrasonic-assisted derivatization – magnetic solid-phase extraction // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2024. V. 237. Article 115764.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115764>
19. Bladec T.; Szymanek-Bany I.; Posyniak A. Determination of polypeptide antibiotic residues in food of animal origin by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Molecules.* 2020. V. 25. Article 3261.
<https://doi.org/10.3390/molecules25143261>
20. Амелин В.Г., Федина Н.М., Подколзин И.В., Коротков А.И. Быстрый скрининг и определение остаточных количеств ветеринарных препаратов в молоке методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии–квадруполь–время-пролетной масс-спектрометрии высокого разрешения // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 6. С. 461. (Amelin V.G., Fedina N.M., Podkolzin I.V., Korotkov A.I. Rapid screening and determination of residual veterinary drugs in milk by ultrahigh performance liquid chromatography–high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. № 6. P. 576.
<https://doi.org/10.1134/S1061934818060023>)

21. Лаврухина О.И., Амелин В.Г., Киш Л.К., Третьяков А.В., Пеньков Т.Д. Определение остаточных количеств антибиотиков в объектах окружающей среды и пищевых продуктах // Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 11. С. 969. (*Lavrukina O.I., Amelin V.G., Kish L.K., Tretyakov A.V., Penkov T.D.* Determination of residual amounts of antibiotics in environmental samples and food products // *J. Anal. Chem.* 2022. V. 77. № 11. P. 1349. <https://doi.org/10.1134/s1061934822110077>)
22. Wang S., Zhou S., Liu W. Opportunities and challenges from current investigations into the biosynthetic logic of nosiheptide-represented thiopeptide antibiotics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013. V. 17. № 4. P. 626. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.021>
23. Chahar G., Deshmukh S., Banga H.S., Kaur P. Effect of feeding chitosan and blend of essential organic acids on growth performance, haematological parameters and innate immunity in early aged male layer chicks // *Trop. Anim. Health. Prod.* 2024. V. 56. Article 251. <https://doi.org/10.1007/s11250-024-04081-0>
24. Технический регламент Таможенного союза (ТР ТС 021/2011) “О безопасности пищевой продукции” (Принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9.12.2011 № 880).
25. GB 31650.1-2022 National food safety standard – Maximum residue limits for 41 veterinary drugs in foods.
26. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
27. Korea’s Positive List System for Veterinary Drugs September 01, 2023.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF AVILAMYCIN AND NOSIHEPTIDE MARKER RESIDUES IN CHICKEN MEAT BY THE HPLC-MS/MS METHOD

D. P. Bulkatov^{a, b}, A. O. Melekhin^{a, *}, M. Yu. Parfenov^c, V. V. Tischenko^a, A. L. Bairov^a

^a*Federal Centre for Animal Health (FGBI ARRIAH)
Vladimir, Russia*

^b*Bauman Moscow State Technical University, STI Center “Digital materials science: new materials and substances”
Moscow, Russia*

^c*Baltic Control
Astana, Kazakhstan*

*E-mail: artem150196@mail.ru

Abstract. Multicomponent residue analysis of veterinary drugs by HPLC-MS/MS is relevant for food safety. A significant problem is the determination of veterinary drugs whose molecules are large in size. Electrospray ionization of such molecules is difficult, and it is difficult to achieve the required sensitivity by classical separation from the matrix with subsequent detection. Such drugs include avilamycin and nosiheptide. To solve this problem, it is possible to fragment the molecules into smaller and easily detectable residues by hydrolysis, which in turn raises the problem of optimizing the conditions of such preparation, as well as assessing the uniqueness of the selected marker. The possibility of simultaneous determination of avilamycin and nosiheptide in chicken meat by their alkaline hydrolysis to the markers dichloroisoverminic acid and 4-hydroxymethyl-3-methylindole-2-carboxylic acid, respectively, has been demonstrated. The conditions of extraction, hydrolysis and methods of further purification were studied. Under the selected conditions, analyte recovery was >85% and satisfactory reproducibility was achieved ($s_r \leq 0.15$). The detection limits were 5 µg/kg. The developed method is highly selective, rapid, easy to perform, inexpensive and has good analytical performance.

Keywords: chicken meat, avilamycin, nosiheptide, HPLC-MS/MS.