

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Научная статья

УДК 579.61: 543.544.5.068.7:620.11:615.281

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-19-34>



Стандартный образец тилозина тартрата

А. Ю. Гуляева , А. Ю. Хрущев , С. В. Колячкина , В. Б. Муравьева , С. В. Антонова 

ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств
для животных и кормов», г. Москва, Россия
[✉ a.gulyaeva@vgntki.ru](mailto:a.gulyaeva@vgntki.ru)

Аннотация: Достаточно часто в современном мире применяют антибиотики для лечения инфекционных заболеваний в медицине и ветеринарии, а также в качестве стимуляторов роста в животноводстве. Бесконтрольное применение антибиотиков приводит к появлению остатков антибиотиков в пищевых продуктах, которые легко передаются человеку по пищевым цепочкам. Из-за этих нежелательных эффектов и в связи с оборотом недоброкачественных и контрафактных лекарственных препаратов необходимо контролировать качество лекарственных препаратов, а также проводить мониторинг пищевой безопасности продукции животноводства путем определения содержания остатков лекарственных препаратов в ней посредством применения стандартных образцов (СО).

Целью настоящего исследования стала разработка СО утвержденного типа состава тилозина тартрата. В ходе выполнения исследования апробирована и успешно реализована методика подготовки исходного материала СО, проведен критический анализ методов измерений содержания тилозина тартрата, обоснован выбор метода ВЭЖХ в качестве основного метода количественного определения аттестованного значения измеряемой величины (массовой доли тилозина). Показаны недостатки микробиологического метода и метода титриметрии, рассмотренных в качестве альтернативных методов. В соответствии с РМГ 93–2015 и ГОСТ ISO Guide 35–2015 оценена стандартная неопределенность аттестованного значения СО от метода характеристики, от неоднородности и от нестабильности материала. Рассчитана расширенная неопределенность аттестованного значения. Результатом выполненных работ явилось утверждение нового типа СО состава тилозина тартрата ГСО 11632–2020.

Нормированные метрологические характеристики: массовая доля тилозина 800–1100 мг/мг, относительная расширенная неопределенность при $k=2$, $P=0,95$ равна 6 %. СО хранится в запаянных ампулах, отдельно от продуктов питания и кормов, в сухом, защищенном от света месте при температуре от +4 °C до -18 °C, срок годности СО 4 года.

Практическая значимость полученных результатов позволяет расширить возможность аттестации методик измерений и контроля точности результатов измерений массовой доли тилозина в лекарственных средствах ветеринарного применения, в продуктах питания и продовольственном сырье, кормах для животных, объектах окружающей среды. СО может также использоваться для определения подлинности тилозина в лекарственных средствах и определения чувствительности патогенных микроорганизмов к тилозину.

Ключевые слова: тилозин, стандартный образец, лекарственный препарат, ветеринария, безопасность пищевой продукции, Таможенный союз

Используемые сокращения: СО – стандартный образец; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

Ссылка при цитировании: Стандартный образец тилозина тартрата / А. Ю. Гуляева [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. 2023. Т. 19, № 2. С. 19–34. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-19-34>

Статья поступила в редакцию 14.11.2022; одобрена после рецензирования 06.02.2023; принята к публикации 25.03.2023.

REFERENCE MATERIALS

Research Article

Certified Reference Material of Tylosin Tartrate

Anastasia Yu. Gulyaeva  , Alexei Y. Khrushchev , Svetlana V. Kolyachkina ,
Victoria B. Muravieva , Svetlana V. Antonova 

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality (VGNI), Moscow, Russia,
 a.gulyaeva@vgni.ru

Abstract: To date, antibiotics are often used in the treatment of infectious diseases in medicine and veterinary medicine, as well as growth promoters in animal husbandry. The uncontrolled use of antibiotics leads to antibiotic residues in food products that are easily transmitted to humans through food chains. Due to these undesirable effects, as well as in connection with the circulation of substandard and counterfeit medicinal products, it is necessary to control the quality of medicinal products, as well as monitor the food safety of animal products by determining the content of drug residues using reference materials (RMs).

The aim of this research was to develop a CRM for the composition of tylosin tartrate.

In the course of the research, a method for preparing the initial RM was tested and successfully implemented, a critical analysis of methods for measuring the content of tylosin tartrate was carried out, and the choice of the HPLC method as the main method for quantitative determination of the certified value of the measured quantity (mass fraction of tylosin) was justified. The disadvantages of the microbiological method and the titrimetry method as alternative methods were shown. In accordance with RMG 93–2015 and GOST ISO Guide 35–2015, the standard uncertainty of the RM certified value from the characterization method, heterogeneity and instability of the material was estimated. The expanded uncertainty of the certified value was calculated. The result of the work performed was the approval of a new type of the CRM for the composition of tylosin tartrate GSO 116322020.

Normalized metrological characteristics: the mass fraction of tylosin is 800–1100 µg/mg, the relative expanded uncertainty at $k=2$, $P=0.95$ is 6%. The CRM is stored in sealed ampoules separately from food and feed in a dry and dark place at a temperature from plus 4 °C to minus 18 °C, the shelf life of the CRM is 4 years.

The practical significance of the results obtained makes it possible to expand the possibility of certification of measurement methods and control of the accuracy of the measurement results of the mass fraction of tylosin in veterinary medicinal products, food and food raw materials, animal feed, and environmental objects. The CRM can also be used to identify tylosin in medicinal products and to determine the susceptibility of pathogens to tylosin.

Keywords: tylosin, reference material, medicinal product, veterinary medicine, food safety, Customs Union

Abbreviations used: CRM – certified reference material; HPLC – high performance liquid chromatography.

For citation: Gulyaeva A. Yu., Khrushchev A. Y., Kolyachkina S. V., Muravieva V. B., Antonova S. V. Certified Reference Material of Tylosin Tartrate. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(2):19–34. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-2-19-34>

The article was submitted 14.11.2022; approved after reviewing 06.02.2023; accepted for publication 25.03.2023.

Введение

В современном мире особую остроту приобретает тема применения антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний в медицине и ветеринарии, а также в качестве стимуляторов роста в животноводстве [1–5].

Для широкого использования антибиотиков в промышленности предъявляют такие требования, как удобство в применении, быстрая всасываемость

и длительная элиминация, высокая терапевтическая эффективность, стабильность готовых лекарственных форм, низкая стоимость. Перечисленным параметрам соответствуют широко используемые лекарственные препараты на основе тилозина [6, 7]. По сведениям, представленным на сайте Государственного реестра лекарственных средств для ветеринарного применения на территории стран Таможенного союза в Российской

Федерации, Республики Беларусь и Республики Казахстан, по состоянию на сентябрь 2022 г. зарегистрировано более 150 препаратов, содержащих в своем составе тилозин и его соли [1].

Тилозин отличается широким терапевтическим действием и хорошей переносимостью у всех видов животных и птицы. В лекарственных препаратах для ветеринарного применения в качестве действующего вещества используется как тилозин в форме основания, так и его соль – тилозина тартрат. Препараты выпускают в форме порошка, микрогранул и растворов. Применяют их с питьевой водой, в виде смеси с кормом, при аэрозольных обработках и обработках инкубационного яйца, а также в виде инъекционных и оральных растворов. Несоблюдение ветеринарных требований по применению таких лекарственных препаратов может приводить к проявлению токсических и аллергических реакций у животных. Также стоит отметить, что использование антибиотиков в животноводстве с нарушением требований инструкции по применению может привести к накоплению их остатков в таких пищевых продуктах, как молоко, яйца, мясо и субпродукты, что представляет риск для человека при употреблении данной продукции в пищу [8, 9]. Одной из основных нежелательных реакций при употреблении данной продукции животного происхождения в пищу является развитие резистентности у микроорганизмов к антимикробным препаратам, что может привести к появлению бактерий высокой вирулентности и снижению эффективности мероприятий по лечению инфекционных болезней человека и животных [3, 8, 10, 11]. Рядом авторов было отмечено, что остаточные следы тилозина могут вызывать аллергические реакции, дисбактериоз, а также оказывать канцерогенное, мутагенное и гепатотоксическое воздействие [12, 13], могут вызывать сложные, неизлечимые и длительные инфекции у людей, приводя к более высоким затратам [3, 4, 8–10]. Из-за этих нежелательных эффектов, а также в связи с обращением недоброкачественных и контрафактных лекарственных средств проводится контроль качества лекарственных препаратов, находящихся в гражданском обороте на территории РФ и мониторинг пищевой безопасности [1, 14–20].

Согласно требованиям Технических регламентов Таможенного союза ТР ТС 034/2013 и ТР ТС 021/2011, мониторингу содержания остатков тилозина с целью установления ветеринарной безопасности подлежит мясо и субпродукты всех видов продуктивных животных, а также молоко и яйца. Действующим законодательством Таможенного союза установлены следующие

предельно допустимые уровни содержания остаточных количеств тилозина в продукции животного происхождения: молоко, яйца – не допускается (на уровне чувствительности определения метода), мясо, печень, почки, жир-сырец – не более 0,1 мг/кг.

Для определения тилозина используют микробиологический и физико-химические методы анализа: планарная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, вольтамперометрия [21–26]. Все перечисленные методики измерений, как правило, включают в себя применение СО утвержденного типа. Таким образом, СО являются важной составляющей для обеспечения единства, сопоставимости и прослеживаемости результатов измерений, необходимых для гарантирования качества лекарственных препаратов, включая контроль точности результатов измерений и подтверждение подлинности исследуемого вещества, обеспечивая установление метрологических характеристик, отвечающих требованиям 102-ФЗ [21, 27].

На сегодняшний день выпускаются такие коммерческие продукты СО тилозина, как Tylosin United States Pharmacopeia Reference Standard № 1703805, Tylosin British Pharmacopoeia Reference Standard № BP349, Tylosin European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard № T2880000 и Tylosin HPC Standards GmbH № 674913 (Германия)¹ [28]. Применение этих СО на территории России затруднено из-за логистических ограничений.

Предварительно проведенный авторами анализ сведений, представленных в ФИФ ОЕИ по состоянию на май 2022 г., свидетельствует об отсутствии достаточного количества СО утвержденного типа, необходимых для метрологического обеспечения измерений, касающихся безопасности пищевой продукции, на которую распространяются технические регламенты ТР ТС 034/2013, ТР ТС 021/2011, и качества лекарственных препаратов для ветеринарного применения.

Привлечение внимания к проблеме обеспечения номенклатуры СО в области здравоохранения и фармацевтической промышленности отражено в работах [29–32].

Поэтому целью настоящего исследования является разработка СО утвержденного типа состава тилозина тартрата.

В задачи исследования входит следующее: обоснование выбора вещества-кандидата на роль СО; осуществление входного контроля материала-кандидата СО;

¹ Tylosin // Merck [website]. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/substance/tylosin916101401690> (дата обращения: 17.10.2022).

определение процедуры аттестации СО; проведение испытания в целях утверждения типа; установление метрологических характеристики СО.

Материалы и методы

Реактивы, растворы и материалы

В качестве материала-кандидата СО использовали высокоочищенную фармацевтическую субстанцию тилозина тартрата с сертификатом качества (производство Sigma-Aldrich, Германия).

В качестве основы для сравнения в рамках измерения аттестованной характеристики был применен СО тилозина Американской фармакопеи (референсный спектр)².

Для подтверждения подлинности материала-кандидата применялся СО тилозина тартрата Американской фармакопеи³.

При выполнении измерений использовали следующие реактивы и расходные материалы: ацетонитрил, ACS реагент $\geq 99,5\%$, х. ч., CAS № 75-05-8; натрия перхлорат, ACS реагент $\geq 98,0\%$, х. ч., CAS № 7601-89-0; соляная кислота концентрированная 37 %, х. ч., CAS № 7647-01-0; вода дистиллированная по ГОСТ 6709; шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм; наконечник для дозаторов различного объема.

Инструменты и условия

Анализ образцов проводили:

– методом ИК-спектроскопии с использованием ИК-Фурье спектрометра инфракрасного, модель Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, США), при следующих инструментальных и программных настройках: суммирование 16 измерений, детектор DTGS KBr, делитель – KBr, усиление сигнала – 1, скорость 0.6329, диафрагма – 100, интерполяция 2-го уровня, аподизация «N-V сильная», фазовая коррекция Mertz [39, 40].

– методом ВЭЖХ. Разделение проводили на колонке Luna 5u C(18) 100A 250*4,60 мм в изократическом режиме, использовали в качестве элюента смесь 9,8 % раствора перхлората натрия и ацетонирила. Детектирование осуществляли в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 290 нм. Данная длина волны была выбрана в ходе экспериментальных исследований при параметрах разработанной методики как являющаяся

наиболее оптимальной для получения пика достаточной интенсивности.

Пробоподготовка исходного материала СО

В соответствии с общими требованиями, предъявляемыми Государственной Фармакопеей Российской Федерации к фармацевтическим субстанциям и зарубежными фармакопеями к качеству субстанции тилозина тартрата, был разработан перечень показателей качества для входного контроля материала СО.

В связи с этим к органическому веществу, выбранному для исследований в качестве вещества-кандидата на роль СО, были определены следующие основные требования: внешний вид, растворимость, окраска и прозрачность раствора, массовая доля тирамина, массовая доля тилозина, потеря в массе при высушивании. Особое внимание уделяли определению подлинности материала СО.

Для подтверждения подлинности субстанций СО использовали физико-химические методы: ИК-спектроскопия в среднем диапазоне и метод ВЭЖХ. Подлинность и качество субстанции оценивали согласно требованиям ОФС.1.2.1.1.0002.15 и ОФС.1.2.1.2.0005.15 Государственной Фармакопеи Российской Федерации.

Анализ образцов методом ИК-спектроскопии

Анализ материала-кандидата СО проводили методом ИК-спектроскопии путем программного сравнения спектральных данных испытуемой субстанции и СО Tylosin Tartrate № 1703850 Американской фармакопеи (референсный спектр) в среднем ИК-диапазоне 400–4000 см⁻¹ (рис. 1)⁴.

Для оценки соответствия спектров сравнивали положения основных полос и их относительных интенсивностей на референсном спектре и спектрах материала-кандидата стандартного образца. Помимо этого был использован пакет программного обеспечения OMNIC (алгоритм классификационного анализа «Search standards»), что позволило более точно провести анализ соответствия спектров во всем диапазоне по характеристикам «волновое число» и «интенсивность сигнала» и вычислить суммарный коэффициент корреляции (R) как функцию дисперсии данных по шкале от 0 до 100 % (значение коэффициента 100 свидетельствует о полном соответствии) [35].

В ходе проведенных исследований методом ИК-спектроскопии коэффициент корреляции между

² Tylosin LOT F0C008. URL: <https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1703805-F0C008.pdf> (дата обращения 17.10.2022).

³ Tylosin Tartrate // The United States Pharmacopeial Convention [website]. URL: <https://store.usp.org/product/1703850> (дата обращения 17.10.2022).

⁴ Tylosin Tartrate // The United States Pharmacopeial Convention [website] <https://store.usp.org/product/1703850> (дата обращения 17.10.2022).

спектром испытуемого образца и референсным спектром составил 96,2%, что свидетельствует о его идентичности по строению и химическому составу референсному спектру ($R > 0,95$ %).

Анализ образцов методом ВЭЖХ

Анализ материала-кандидата СО проводили методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 290 нм путем сравнения времени удерживания

основных пиков испытуемой субстанции и СО Tylosin Tartrate № 1703850 Американской фармакопеи.

В ходе подтверждения подлинности материала методом ВЭЖХ установлено, что время удерживания основных пиков материала СО совпало по времени удерживания основных пиков основы для сравнения (рис. 2, 3).

После проведения входного контроля и установления соответствия материала-кандидата СО заявленным требованиям исходное сырье было расфасовано по (50 ± 10) мг в запаянные стеклянные прозрачные

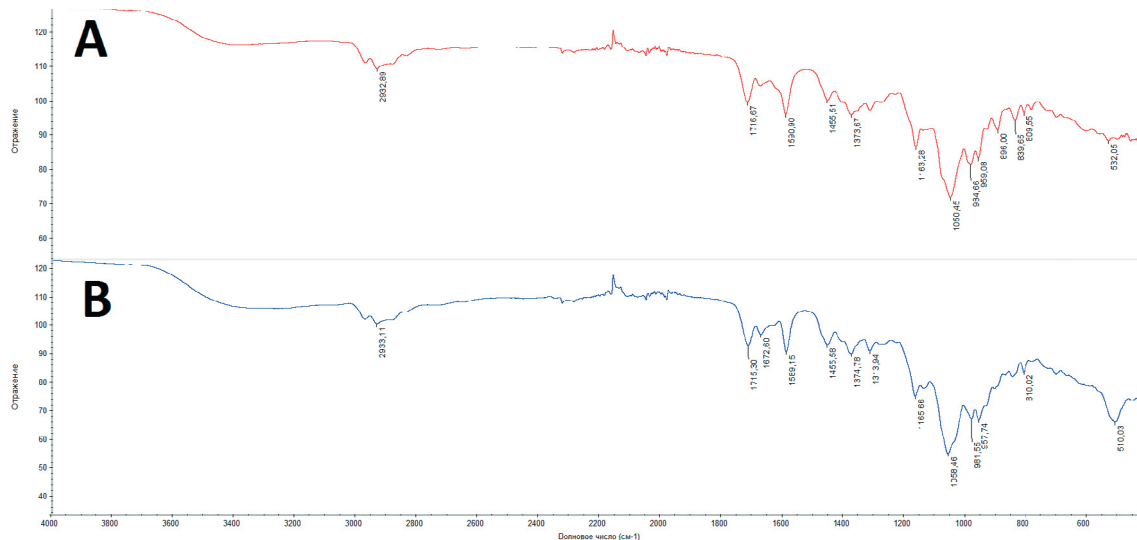


Рис. 1. ИК-спектры референсного спектра материала-кандидата стандартного образца тилозина тартрата (А) и материала стандартного образца Tylosin Tartrate № 1703850 Американской фармакопеи (В)

Fig. 1. IR spectra of the reference spectrum of the candidate reference material of tylosin tartrate (A) and reference material of tylosin tartrate No. 1703850 of the American Pharmacopoeia (B)

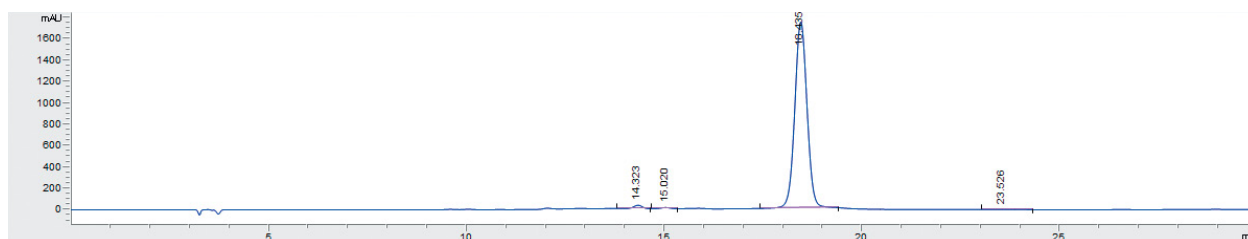


Рис. 2. Хроматограмма основы для сравнения: стандартный образец Tylosin Tartrate № 1703850 Американской фармакопеи
Fig. 2. Chromatogram of reference base: the reference material of tylosin tartrate No. 1703850 American Pharmacopoeia

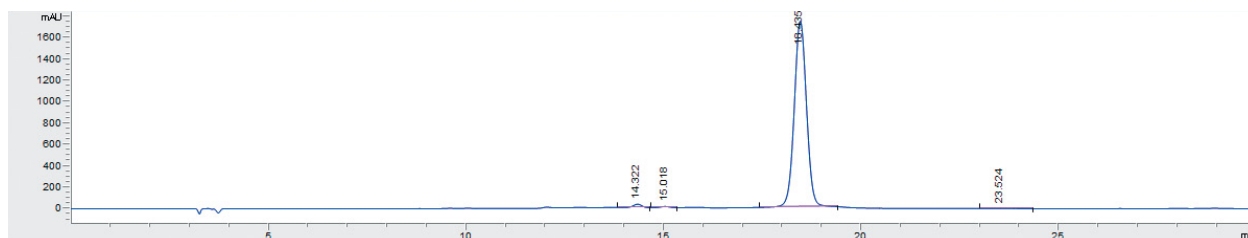


Рис. 3. Хроматограмма материала-кандидата стандартного образца состава тилозина тартрата
Fig. 3. Chromatogram of the candidate reference material for the composition of tylosin tartrate

ампулы для лекарственных средств для проведения исследований по определению метрологических характеристик СО.

Установление метрологических характеристик материала-кандидата СО

С учетом требований РМГ 93–2015, ГОСТ 8.315-2019 для характеристики СО был выбран способ с использованием аттестованной методики измерений методом внешнего стандарта. В связи с чем в рамках запланированной работы была разработана и аттестована МУ А-1/065 «Методика измерений содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии». Методика основана на применении метода ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 290 нм. Исследование однородности и стабильности материала СО проведено с использованием аттестованной методики измерений массовой доли тилозина (МУ А-1/065) в соответствии с положениями РМГ 93–2015.

Результаты и обсуждение

Существует несколько методов определения аттестованного значения СО, например: метод прямого определения количественного содержания – метод титрования, косвенный метод – метод «массового баланса» и метод внешнего стандарта. Тилозин состоит из четырех основных близкородственных соединений, соотношение между которыми может варьироваться. Поэтому мы предположили, что использование метода неводного титрования не может гарантировать получение достоверных результатов. В то же время Американская и Европейская фармакопеи предлагают для количественного определения тилозина использовать микробиологический метод. Данный метод основан на способности тилозина угнетать рост микроорганизмов. Определения при этом проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-культур микроорганизмов. Характерным признаком,

отличающим метод диффузии в агар, является достаточная трудоемкость и продолжительность по времени. Результаты измерений при этом зависят от многих факторов, в том числе от свойств тест-микроорганизмов, питательных сред, от наименования антибиотика, а также от навыков сотрудника, проводящего исследования [36].

Помимо микробиологического метода диффузии в агар, наряду с общепринятым фармакопейным методом, для установления содержания тилозина в материале СО применяют инструментальный метод ВЭЖХ [37, 38].

Таким образом, для подтверждения аттестованной характеристики – массовая доля тилозина – было принято решение применить микробиологический метод диффузии в агар и метод ВЭЖХ.

Методика измерений содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата микробиологическим методом основана на способности молекулы тилозина диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны угнетения, в которых не растет используемый штамм *Micrococcus luteus* ATCC 9341, чувствительный к антибиотик. Определение проводили методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-культур микроорганизмов.

Методика измерений содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата методом ВЭЖХ (МУ А-1/065) основана на применении метода ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 290 нм.

Метрологические характеристики методик измерений массовой доли тилозина микробиологическим методом диффузии в агар и методом ВЭЖХ представлены в табл. 1 и 2.

Результаты проведения аттестации методик и установления метрологических характеристик (табл. 1, 2), свидетельствуют, что методика определения основного вещества методом ВЭЖХ имеет более высокую точность по сравнению с методикой, основанной на микробиологическом методе. При этом по результатам

Таблица 1. Метрологические характеристики методики измерений содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата методом ВЭЖХ

Table 1. Metrological characteristics of the method for measuring the content of tylosin in the substance of tylosin tartrate by high performance liquid chromatography

Измеряемая величина	Диапазон измерений содержания тилозина, мкг/мг	Относительная расширенная неопределенность при доверительной вероятности $P=0,95$, U_p , %
Массовая доля тилозина	от 800 до 1100 включ.	3,2

*Соответствует границам относительной погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$

Таблица 2. Метрологические характеристики методики измерений содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата микробиологическим методом

Table 2. Metrological characteristics of the method for measuring the content of tylosin in the substance of tylosin tartrate by the microbiological method

Измеряемая величина	Диапазон измерений содержания тилозина, мкг/мг	Относительная расширенная неопределенность при доверительной вероятности $P=0,95$, U_p^* , %
Массовая доля тилозина	от 800 до 1100 включ.	6

*Соответствует границам относительной погрешности при доверительной вероятности $P=0,95$

проведенных измерений содержания тилозина двумя методами отмечена сходимость результатов в пределах погрешности методик.

С учетом того, что измерение содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата методом ВЭЖХ имеет меньшие трудозатраты, а также более высокую точность определения, она выбрана для проведения дальнейших работ по разработке СО тилозина. Метод ВЭЖХ применяли для оценки аттестованного значения массовой доли тилозина в СО, изучения стабильности и однородности СО.

Определение аттестованного значения стандартного образца и оценивание стандартной неопределенности от способа определения аттестованного значения

Аттестуемая характеристика, по которой проводили определение аттестованного значения стандартного образца состава тилозина тартрата – массовая доля тилозина, мкг/мг.

В целях определения аттестованного значения СО в отобранных случайным образом пробах материала измеряли массовую долю тилозина согласно разработанной и аттестованной методике МУ А-1/065 при различных уровнях промежуточной прецизионности, как было описано выше.

Оценку полученных результатов для установления аттестованного значения и стандартной неопределенности

от способа определения аттестованного значения СО проводили в соответствии с РМГ 93–2015. Полученное значение аттестованной характеристики СО, стандартной неопределенности от способа определения аттестованного значения СО приведены в табл. 3.

Полученные результаты далее были применены при оценивании расширенной неопределенности аттестованного значения стандартного образца состава тилозина тартрата.

Исследование однородности материала стандартного образца

Изучение однородности материала СО проводили одновременно с определением аттестованного значения. Учитывая то, что материал–кандидат СО является дисперсным материалом, исследование однородности выполняли путем многократных измерений аттестованного значения в нескольких пробах, отобранных случайным образом от всего объема материала СО. Так, от всей приготовленной партии отбирали ампулы с материалом ($N=12$), из которых затем путем взвешивания брали необходимое количество для проведения измерений ($J=2$) в условиях повторяемости.

Операции с пробами и измерения массовой доли тилозина проводили в соответствии с методикой измерений МУ А-1/065, описанной выше.

Обработку полученных результатов проводили согласно схеме однофакторного дисперсионного анализа

Таблица 3. Результаты определения аттестованного значения стандартного образца состава тилозина тартрата, стандартной неопределенности от способа характеристики аттестованного значения стандартного образца

Table 3. The results of determining the certified value of the certified reference material for the composition of tylosin tartrate, the standard uncertainty from the method of characterizing the certified value of the certified reference material

Аттестуемая характеристика	Аттестованное значение стандартного образца $\hat{A}$, мкг/мг	Стандартная неопределенность от способа характеристики $\hat{A}$ СО, u_{char}
Массовая доля тилозина, мкг/мг	968,9	15,78 мкг/мг

в соответствии с положениями РМГ 93–2015. Результаты оценивания неоднородности материала СО состава тилозина тартрата приведены в табл. 4.

Полученные результаты использовали при оценивании расширенной неопределенности аттестованного значения СО.

Исследование стабильности материала стандартного образца

Для изучения стабильности, с целью определения срока годности и условий хранения СО, а также стандартной неопределенности от нестабильности материала СО использовали способ изохронного исследования стабильности «методом ускоренного старения» с учетом положений РМГ 93–2015 и ГОСТ ISO Guide 35–2015. Принцип данного метода заключается в усилении воздействия факторов, вызывающих тренд аттестованной характеристики за период времени, намного меньше срока годности СО.

Для расчета времени старения применяли правило Вант-Гоффа для медленных реакций: скорость реакции при нагреве на 10 °С увеличивается в 2–4 раза, в соответствии РМГ 93–2015.

Для изучения долговременной и кратковременной стабильности случайным образом отбирали заранее рассчитанное количество необходимых экземпляров СО и закладывали их при пониженных и повышенных температурах.

В качестве предполагаемых условий хранения выбрали следующие условия: СО хранится в запаянных ампулах, отдельно от продуктов питания и кормов, в сухом, защищенном от света месте при температуре от +4 °С до -18 °С.

Для исследования стабильности отбирали 13 экземпляров СО, закладывали при пониженных

и повышенных температурах для изучения долговременной стабильности.

Продолжительность изучения стабильности рассчитывали на основе предполагаемого срока годности СО – 4 года и фиксированных значений температуры хранения. Продолжительность исследования стабильности τ оценивали по формуле:

$$\tau = \frac{T}{2^{\frac{t_1 - t_0}{10}}}, \quad (1)$$

где T – предполагаемый срок годности экземпляра СО;

t_0, t_1 – температура хранения материала СО и температура хранения СО при ускоренном старении соответственно.

Период исследования стабильности при температурах предполагаемых условий хранения +4 °С и повышенной температуре +43 °С составил 96 дней. Измерения проводили через равные промежутки времени один раз в двенадцать дней.

Результаты оценивания долговременной стабильности материала СО представлены в табл. 5.

Для оценки влияния низких температур отбирали 5 экземпляров СО и помещали в морозильную камеру бытового холодильника при температуре -18 °С. Измерения значений аттестуемой характеристики проводили один раз в пять дней.

Все измерения проводили в условиях повторяемости по методике измерений МУ А-1/065, выполненных для установления аттестованного значения в соответствии с вышеописанными параметрами хроматографического анализа.

Обработку полученных результатов проводили в соответствии с ГОСТ ISO Guide 35–2015.

Таблица 4. Результаты оценивания неоднородности материала стандартного образца состава тилозина тартрата

Table 4. The results of assessing the heterogeneity of the certified reference material for the composition of tylosin tartrate

Аттестуемая характеристика	Результаты промежуточных расчетов				Стандартная неопределенность от неоднородности материала СО, u_h , мкг/мг (абсолютная)
	SSe	SSH	$\overline{SS}_e$	$\overline{SS}_h$	
Массовая доля тилозина, мкг/мг	203,50	1838,46	16,96	167,13	8,67

SSe – сумма квадратов отклонений результатов измерений от средних значений каждой пробы;

SSH – сумма квадратов отклонений средних результатов для каждой пробы от среднего арифметического значения всех результатов измерений;

$\overline{SS}_e$ – квадрат стандартного отклонения средних результатов по пробам;

$\overline{SS}_h$ – квадрат стандартного отклонения средних результатов между пробами.

Таблица 5. Результаты оценивания долговременной стабильности материала стандартного образца состава тилозина тартрата

Table 5. The results of assessing the long-term stability of the certified reference material for the composition of tylosin tartrate

Период времени, дни	Предполагаемый срок годности, Т, дни	Массовая доля тилозина, мкг/ мг	Стандартная неопределенность от нестабильности стандартного образца, u_{stab} , мкг/мг
12	178,8	973	3,41
24	357,6	965	
36	536,4	968	
48	715,2	971	
60	894,0	968	
72	1072,8	969	
84	1251,6	968	
96	1430,4	976	

Для расчета стандартного отклонения, связанного с наклоном графической зависимости массовой доли тилозина от времени, использовали формулу:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}}, \quad (2)$$

где s – стандартное отклонение точек от линии;

$s(b_1)$ – стандартное отклонение b_1 ;

X_j – количество дней при естественном хранении, соответствующее дням при «ускоренном» старении, дни;

$\bar{X}$ – среднее количество дней при естественном хранении, дни.

Для оценки уровня наклона применяли неравенство:

$$|b_1| < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1), \quad (3)$$

где $t_{0,95, n-2}$ – критерий Стьюдента (t -критерий) для $n - 2$ степеней свободы и $p = 0,95$ (95 % доверительный уровень);

$s(b_1)$ – стандартное отклонение b_1 ;

b_1 – наклон графической зависимости.

Результаты расчетов представлены в табл. 6.

Полученные данные свидетельствуют о выполнении неравенства согласно формуле 3 и позволяют заключить, что наклоны незначительные, и, следовательно, нестабильность материала СО не наблюдается.

По результатам проведенных исследований контроля стабильности и испытаний по оценке влияния пониженной температуры -18°C установлен срок годности СО тилозина тартрата 4 года при хранении при температуре от $+4^\circ\text{C}$ до -18°C .

Таблица 6. Результаты изучения стабильности СО состава тилозина тартрата и оценки влияния пониженных температур

Table 6. The results of studying the stability of the certified reference material for the composition of tylosin tartrate and assessing the effect of low temperatures

Показатель	Изучение стабильности в условиях «ускоренного старения» при повышенной температуре (при $+43^\circ\text{C}$)	Исследования влияния пониженных температур на материал стандартного образца (при -18°C)
$s(b_1)$	0,00239	0,004887
Критерий Стьюдента (t -критерий) для $(n - 2)$, $t_{0,95, n-2}$	2,365, при $n=7$	2,776, при $n=4$
$ b_1 < t_{0,95, n-2} \cdot s(b_1)$	$10,00201 < 0,00565$	$10,0013741 < 0,013567$

Для установления метрологических характеристик СО оценивали стандартную неопределенность от нестабильности u_{stab} в момент времени t по формуле:

$$u_{stab} = s(b_1) \cdot T = 3,41 \text{ мкг/мг}, \quad (4)$$

где $s(b_1)$ – стандартное отклонение b_1 ;

T – предполагаемый срок годности СО, дни.

Полученное значение u_{stab} учитывали при определении расширенной неопределенности аттестованного значения СО.

Метрологические характеристики стандартного образца

Расширенную неопределенность аттестованного значения СО состава тилозина тартрата рассчитывали согласно РМГ 93–2015 по формуле:

$$U(\hat{A}) = 2 \cdot \sqrt{u_{char}^2 + u_h^2 + u_{stab}^2}, \quad (5)$$

где $U(\hat{A})$ – расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k=2$;

u_{char} – стандартная неопределенность от способа установления аттестованного значения материала стандартного образца;

u_h – стандартная неопределенность от неоднородности материала стандартного образца;

u_{stab} – стандартная неопределенность от нестабильности материала стандартного образца.

Полученные нормированные метрологические характеристики разработанного СО приведены в табл. 7.

В рамках испытаний в целях утверждения типа СО была обеспечена прослеживаемость результатов измерений к единице величины «массовая доля», воспроизводимой ГЭТ 208–2019, путем проведения подтверждающих измерений массовой доли основного вещества на Государственном вторичном эталоне единиц массовой доли и массовой (молярной) концентрации органических компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе газовой и жидкостной хроматографии ГВЭТ 208–1–2016 [46].

Заключение

По результатам проведенного исследования разработан СО утвержденного типа состава тилозина тартрата ГСО 11632–2020. Материал СО представляет собой субстанцию тилозина тартрата, гигроскопичный порошок от белого до слегка желтого цвета; материал расфасован по (50 ± 10) мг в запаянные стеклянные ампулы, снабженные этикеткой. Нормированные метрологические характеристики: массовая доля тилозина 800–1100 мкг/мг, относительная расширенная неопределенность при $k=2$, $P=0,95$ равна 6%. СО хранится в запаянных ампулах, отдельно от продуктов питания и кормов, в сухом, защищенном от света месте при температуре от $+4^\circ\text{C}$ до -18°C , срок годности СО 4 года.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи: осуществлен входной контроль материала; определена процедура аттестации СО; проведены испытания в целях утверждения типа и установлены метрологические характеристики СО.

Для установления содержания аттестованного значения СО применяли два метода: микробиологический метод диффузии в агар и метод ВЭЖХ. Но так как методика количественного определения аттестованного значения измеряемой величины (массовой доли тилозина) методом ВЭЖХ имеет более высокую точность по сравнению с методикой, основанной на микробиологическом методе, измерения проводили методом ВЭЖХ. При этом по результатам проведенных измерений содержания тилозина двумя методами отмечена сходимость результатов в пределах погрешности методик. В соответствии с РМГ 93–2015 и ГОСТ ISO Guide 35–2015 оценена стандартная неопределенность аттестованного значения СО от метода характеристики, от неоднородности и от нестабильности материала. Рассчитана расширенная неопределенность аттестованного значения. Установлена прослеживаемость результатов измерений к единице величины «массовая доля», воспроизводимой ГЭТ 208–2019, обеспечена путем проведения подтверждающих измерений массовой доли основного вещества на ГВЭТ 208–1–2016.

Таблица 7. Нормированные метрологические характеристики стандартного образца состава тилозина тартрата

Table 7. Normalized metrological characteristics of the certified reference material for the composition of tylosin tartrate

Аттестуемая характеристика	Интервал допускаемых аттестованных значений СО, мкг/мг	Допускаемые значения относительной расширенной неопределенности при $k=2$, %
Массовая доля тилозина	от 800 до 1100 включ.	6

Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в том, что результаты исследовательской части могут быть использованы для метрологического обеспечения измерений, касающихся безопасности пищевой продукции, на которые распространяются технические регламенты ТР ТС 034/2013, ТР ТС 021/2011, и качества лекарственных препаратов для ветеринарного применения.

Практическая значимость полученных результатов позволяет расширить возможность аттестации методик измерений и контроля точности результатов измерений массовой доли тилозина в лекарственных средствах ветеринарного применения, в продуктах питания и продовольственном сырье, кормах для животных, объектах окружающей среды. СО может также использоваться для определения подлинности тилозина в лекарственных средствах и определения чувствительности патогенных микроорганизмов к тилозину.

Благодарности: Исследования выполнены в ФГБУ «ВГНКИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Разработка государственных стандартных образцов (ГСО) тилозина и доксициклина» (2019–2020 гг.) (государственная работа «Проведение прикладных научных исследований»). Все измерения проводились с использованием оборудования ФГБУ «ВГНКИ».

Acknowledgments: The research was carried out at the Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality (VGNKI) as part of the research work on the project «Development of certified reference materials (GSO) of tylosin and doxycycline» (2019–2020) as part of the State work «Applied scientific research». All measurements were carried out using the equipment of the Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality.

Вклад соавторов: Гуляева А. Ю. — общее руководство исследования, разработка концепции исследования, сбор и анализ экспериментальных данных, сбор литературных данных, оформление документов по испытаниям СО в целях утверждения типа, написание черного варианта статьи; Хрущев А. Ю. — получение и анализ

экспериментальных данных по ИК-спектроскопии, проверка и редакция текста статьи; Колячкина С. В. — проведение исследовательских работ, разработка методики, получение экспериментальных данных; Муравьева В. Б. — проведение исследовательских работ, разработка методики, получение экспериментальных данных; Антонова С. В. — сбор литературных данных, проверка и редакция текста статьи.

Contribution of the authors: Gulyaeva A. Yu. — general research management, development of the research concept, collection and analysis of experimental data, collection of literature data, preparation of documents on RM tests for type approval, writing a draft of the article; Khrushchev A. Y. — acquisition and analysis of experimental data on IR spectroscopy, revision of the text; Kolyachkina S. V. — conducting research, developing methods, experimental data acquisition; Muravieva V. B. — conducting research, developing methods, experimental data acquisition; Antonova S. V. — collection of literary data, revision of the text.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материал статьи подготовлен на основе доклада, представленного на V Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях» (Екатеринбург, 13–16 сентября 2022 г.). Материал статьи допущен к публикации после доработки материалов тезисов доклада, оформления статьи и проведения процедуры рецензирования. Переводная версия статьи на английском языке планируется к публикации в книге Sobina E. et al. (eds.). Reference Materials in Measurement and Technology. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest. The material of the article was prepared on the basis of the report presented at the V International Scientific Conference «Reference Materials in Measurement and Technology» (Yekaterinburg, September 13–16, 2022). A translated version of the article in English is planned for publication in the book Sobina E. Et al. (eds.). Reference Materials in Measurement and Technology. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Третьякова О. С., Заднипрый И. В. Отечественная система государственного контроля качества лекарственных средств и изделий медицинского назначения на современном этапе // Таврический медико-биологический вестник. 2021. Т. 24, № 4. С. 59–68. <https://doi.org/10.37279/2070-8092-2021-24-4-59-68>
2. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications / C. Manyi-Loh [et al.] // Molecules. 2018. Vol. 23, № 4. P. 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
3. Health concerns and management of select veterinary drug residues / R. E. Baynes [et al.] // Food and Chemical Toxicology. 2016. Vol. 88. P. 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>

4. *Bacanli M., Basaran N.* Importance of antibiotic residues in animal food // *Food and Chemical Toxicology*. 2019. Vol. 2, № 125. P. 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
5. *Castanon J. I. R.* History of the use of antibiotic as growth promoters in european poultry feeds // *Poultry Science*. 2007. Vol. 86. P. 2466–2471. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>
6. *Mark G. Tylosin*. In: *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)*. Small and Large Animal. 2016. P. 826–827. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00579-9>
7. *Толкач Н. Г.* Лечение телят, больных гастроэнтеритом, с использованием тилозиновых антибиотиков // Ученые записки учреждения образования витебская ордена знак почета государственная академия ветеринарной медицины. 2012. Т. 48, № 1. С. 145–148.
8. *Макаров Д. А., Комаров А. А., Селимов Р. Н.* Обеспечение химической безопасности пищевой продукции в Российской Федерации // Контроль качества продукции. 2017. № 5. С. 21–26.
9. Разработка стандартного образца состава тилозина тартрата / Гуляева А. Ю. [и др.] // Стандартные образцы в измерениях и технологиях : тезисы докладов V Международной научной конференции, 13–16 сентября 2022 г., Екатеринбург. Екатеринбург: ФГУП «ВНИИМ им. Д. И. Менделеева», 2022. С. 57–58.
10. *Зайнуллина А. Р., Петухова Е. В., Яковлева Г. Ю.* Создание микробиологического экспресс – метода определения антибиотиков в молоке // Вестник технологического университета. 2017. Т. 20, № 21. С. 119–122.
11. Разработка экспресс-методики для определения тилозина в продукции животноводства / Бакай К. А. [и др.] // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко. 2021. Т. 82. С. 34–39. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-18-4>
12. *Чаллыгина О. С., Прокопов А. Ю., Белова Д. Д.* Определение остаточного количества антибиотиков в продуктах животного происхождения // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2022. Т. 84, № 1. С. 140–148. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2022-1-140-148>
13. Antibiotic residues and mycotoxins in raw milk in Punjab 15 (India): A rising concern for food safety / P. Moudgil [et al.] // *Journal of Food Science and Technology*. 2019. Vol. 56, № 11. P. 5146–5151. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03963-8>
14. *Мельникова О. А.* Понятие фальсифицированных, контрафактных и недоброкачественных лекарственных препаратов с позиции права // Медицинское право. 2020. № 2. С. 29–36.
15. *Илиббаева Е. С.* Фальсифицированные лекарственные средства для ветеринарного применения как компонент предмета преступления, предусмотренного в ст. 238.1 уголовного кодекса Российской Федерации // Теория и практика общественного развития. 2018. № 5. С. 144–146. <https://doi.org/10.24158/tipor.2018.5.29>
16. Tylosin content in meat and honey samples over a two-year period in Croatia / B. S. Kolanović [et al.] // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2014. Vol. 35, № 1. P. 37–47. <https://doi.org/10.1080/15321819.2013.784198>
17. *Татарчук О. П.* Тилозин тартрат: рациональная антибиотикотерапия // Ветеринария. 2004. № 4. С. 11–12.
18. *Толкач Н. Г.* Лечение телят, больных гастроэнтеритом, с использованием тилозиновых антибиотиков // Ученые записки учреждения образования Витебская государственная академия ветеринарной медицины. 2012. Т. 48, № 1. С. 145–148.
19. *Cháfer-Pericás C., Maquieira A., Puchades R.* Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010. Vol. 29, № 9. P. 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>
20. Monitoring and detection of antibiotic residues in animal derived foods: Solutions using aptamers / Y. Liu [et al.] // *Trends in Food Science & Technology*. 2022. Vol. 125. P. 200–235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.008>
21. Стандартные образцы антибактериальных веществ утвержденного типа: принцип разработки / А. Ю. Гуляева [и др.] // Эталон. Стандартные образцы. 2020. Т. 16, № 4. С. 27–38. <https://doi.org/10.20915/2687-0886-2020-16-4-27-38>
22. Determination of tylosin, spiramycin, and erythromycin residues in Egyptian buffaloes' meat by thin-layer chromatography-bioautography / M. B. M. Ahmed [et al.] // *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 2013. Vol. 26, № 5. P. 409–416. <https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.5.4>
23. Вольтамперометрический способ определения тилозина тартрата в лекарственных препаратах, применяемых в ветеринарии / В. И. Дерябина [и др.] // Достижения науки и техники АПК. 2014. № 2. С. 72–74.
24. Determination of six macrolide antibiotics in chicken sample by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on solid phase extraction / C. Lan [et al.] // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2019. P. 6849457. <https://doi.org/10.1155/2019/6849457>
25. Rapid RP HPLC method with PDA detection for tylosin determination in liquid samples / Z. Yaneva [et al.] // *Trakia Journal of Sciences*. 2015. Vol. 13. P. 309–314. <https://doi.org/10.15547/tjs.2015.s.02.066>
26. *Przenioslo-Siwczyńska M., Grelik A., Kwiatek K.* Identification and quantification of tylosin in animal feed by liquid chromatography combined with electrospray ionisation mass spectrometry // *Journal of Veterinary Research*. 2020. Vol. 64. P. 299–304. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0031>
27. Стандартные образцы в области ветеринарии / А. Ю. Гуляева [и др.] // Стандартные образцы в измерениях и технологиях: сборник трудов III международной научной конференции, 11–14 сентября 2018 г., Екатеринбург. Екатеринбург: ФГУП УНИИМ, 2018. С. 54–55.
28. Preparation and characterisation of in-house reference material of tylosin in honey and results of a proficiency test / D. A. Bohm [et al.] // *Analitica Chimica Acta*. 2011. Vol. 700, № 1–2. P. 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.058>

29. Осинцева Е. В., Медведевских С. В. Тенденции в области стандартных образцов в России. Эталоны // Стандартные образцы. 2015. № 4. С. 3–21. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2015-0-4-3-21>
30. Осинцева Е. В. Тенденции и перспективы развития номенклатуры стандартных образцов в Российской Федерации // Стандартные образцы в измерениях и технологиях: сборник трудов II международной научной конференции, 14–18 сентября 2015, Екатеринбург. Екатеринбург: ФГУП УНИИМ, 2015. С. 68–70.
31. Студенок В. В., Кремлева О. Н. Стандартные образцы в области здравоохранения и фармацевтической промышленности. Механизмы планирования необходимой номенклатуры стандартных образцов // Проблемы метрологического обеспечения в здравоохранении и производстве медицинской техники: сборник тезисов докладов IX научно-технической конференции, 26–30 сентября 2022, Сочи. Москва: ФГУП ВНИИОФИ, 2019. С. 47–49.
32. Студенок В. В., Кремлева О. Н. Стандартные образцы в системе метрологического обеспечения количественного анализа // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2019. Т. 85, № 1(II). С. 130–134. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2019-85-1-II-130-134>
33. Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. М.: МГУ имени М. В. Ломоносова, 2012. С. 4–31.
34. Купцов А. Х., Жижин Г. Н. Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров. Справочник. М.: Физматлит, 2001. С. 26–29.
35. Baibing L., Julian M., Elaine B. M. Generalized partial least squares regression based on the penalized minimum norm projection // Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2004. Vol. 72, № 1. P. 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.01.026>
36. Кулешова С. И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2015. № 3. С. 13–17.
37. Validation method for determining enrofloxacin and tylosin levels in broiler liver, kidney, and muscle using high-performance liquid chromatography / W. A. Dwi [et al.] // Veterinary World. 2022. Vol. 15, № 2. P. 268–274. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.268-274>
38. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection / P. A. Blackwell [et al.] // Journal of Chromatography A. 2004. № 1045, № 1–2. P. 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.063>
39. Разработка государственного вторичного эталона и стандартных образцов состава на основе жидкостной и газовой хроматографии / О. С. Шохина [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. 2017. Т. 13, № 1. С. 9–26. <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2017-13-1-9-26>

REFERENCE

1. Tretyakova O. S., Zadnipyany I. V. The domestic system of state quality control of medicines and medical devices at the present stage. *Tauride Medical and Biological Bulletin*. 2021;24(4):59–68. (In Russ.). <https://doi.org/10.37279/2070-8092-2021-24-4-59-68>
2. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*. 2018;23(4):795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
3. Baynes R. E., Dedonder K., Kissell L., Mzyk D., Marmulak T., Smith G. et al. Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food and Chemical Toxicology*. 2016;88:112–122. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.020>
4. Bacanlı M., Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*. 2019;2(125):462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
5. Castanon J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in european poultry feeds. *Poultry Science*. 2007;86:2466–2471. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>
6. Mark G. Tylosin. In: Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition). Small and Large Animal. 2016. P. 826–827. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00579-9>
7. Tolkach N. G. Treatment of calves, gastroenteritis patients, using тилозиновых antibiotics. *Transactions of the educational establishment “Vitebsk the Order of “the Badge of Honor” State Academy of Veterinary Medicine”*. 2012;48(1):145–148. (In Russ.).
8. Makarov D. A., Komarov A. A., Selimov R. N. Ensuring the chemical safety of food products in the Russian Federation. *Product quality control*. 2017;(5):21–26. (In Russ.).
9. Gulyaeva A. Yu., Akmaev E. R., Muravieva V. B., Khrushchev A. Yu., Soboleva N. I., Bondarenko V. O. et al. Development of the certified reference material for tylosine tartrate. In: *Reference Materials in Measurement and Technology: Proceedings V International Scientific Conference*, 13–16 September 2022, Yekaterinburg, Russia. Yekaterinburg: VNIIM; 2022. Vol. Ru. p. 57–58. (In Russ.).
10. Zainullina A. R., Petuhova E. V., Yakovleva G. Y. Creation of a microbiological express method for the determination of antibiotics in milk. *Bulletin of the Technological University*. 2017;20(21):119–122 (In Russ.).
11. Bakai K. A., Priyma A. D., Safronova V. A., Nesterenko I. S. Development of an express method for the determination of tylosin in live-stock products. *Proceedings of the All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya. R. Kovalenko*. 2021;(82):34–39. (In Russ.). <https://doi.org/10.31016/viev-2021-18-4>
12. Chaplygina O. S., Prosekov A. Y., Belova D. D. Determination of antibiotic residues in animal products. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2022;84(1):140–148. (In Russ.). <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2022-1-140-148>

13. Moudgil P., Bedi J. S., Aulakh R. S., Wang M.– L. et al. Antibiotic residues and mycotoxins in raw milk in Punjab 15 (India): A rising concern for food safety. *Journal of Food Science and Technology*. 2019;56(11):5146–5151. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03963-8>
14. Melnikova O. A. The concept of falsified, counterfeit and poor-quality medicinal products from the legal standpoint. *Medical Law*. 2020;(2):29–36. (In Russ.).
15. Ilikbaeva E. S. Counterfeit animal drugs as a component of a target of crime stipulated in article 238.1 of the Criminal code of the Russian federation. *Theory and Practice of Social Development*. 2018;5:144–146. <https://doi.org/10.24158/tipor.2018.5.29>
16. Kolanović B. S., Bilandžić N., Varenina I., Božić D. Tylosin content in meat and honey samples over a two-year period in Croatia. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2014;35(1):37–47. <https://doi.org/10.1080/15321819.2013.784198>
17. Tatarchuk, O. P. Tylosin tartrate: rational antibiotic therapy. *Veterinary*. 2004;4:11–12.
18. Tolkach, N. G. Treatment of calves, gastroenteritis patients, using тилозиновых antibiotics. *Transactions of the educational establishment "Vitebsk the Order of "the Badge of Honor" State Academy of Veterinary Medicine"*. 2012;48(1):145–148. (In Russ.).
19. Cháfer-Pericás C., Maquieira A., Puchades R. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29(9):1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>
20. Liu Y., Deng Y., Li S., Chow F. W.-N., Liu M. Monitoring and detection of antibiotic residues in animal derived foods: Solutions using aptamers. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;125:200–235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.008>
21. Gulyaeva A. Yu., Kis I. V., Kolyachkina S. V., Khrushchev A. Y. Certified reference materials of antibacterial substances: principle of development. *Measurement standards. Reference materials*. 2020;16(4):27–38. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2687-0886-2020-16-4-27-38>
22. Ahmed M. B. M., Sree Y. H. A., Abdel-Fattah S. M. et al. Determination of tylosin, spiramycin, and erythromycin residues in Egyptian buffaloes' meat by thin-layer chromatography-bioautography. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 2013;26(5):409–416. <https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.5.4>
23. Deryabina V. I., Nyung Ph. K., Akeneev Yu. A., Safonov D. N. Voltammetric method for the determination of tylosin tartrate in drugs used in veterinary medicine. *Achievements of science and technology of the APK*. 2014;2:72–74. (In Russ.).
24. Lan C., Yin D., Yang Z., Zhao W., Chen Y., Zhang W. et al. Determination of six macrolide antibiotics in chicken sample by liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on solid phase extraction. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2019;6849457. <https://doi.org/10.1155/2019/6849457>
25. Yaneva Z., Georgieva N., Koinarski V. and Petrova D. Rapid RP HPLC method with PDA detection for tylosin determination in liquid samples. *Trakia Journal of Sciences*. 2015;13:309–314. <https://doi.org/10.15547/tjs.2015.s.02.066>
26. Przeniosło-Siwczyńska M., Grelik A., Kwiatek K. Identification and quantification of tylosin in animal feed by liquid chromatography combined with electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Veterinary Research*. 2020;64:299–304. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0031>
27. Guljaeva A. Ju., Kis I. V., Koljachkina S. V., Komarov A. A. Veterinary reference materials. In: *Reference Materials in Measurement and Technology: Proceedings III International Scientific Conference*, 11–14 September 2018, Yekaterinburg, Russia. Yekaterinburg: UNIIM; 2018, Vol. Ru, 54–55 pp. (In Russ.).
28. Bohm D. A., Stachel C. S., Hackenberg R., Gowik P. Preparation and characterisation of in-house reference material of tylosin in honey and results of a proficiency test. *Analitica Chimica Acta*. 2011;700(1–2):58–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.058>
29. Osintseva E. V., Medvedevskikh S. V. Trends in field of reference materials in Russia. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2015;(4):3–21. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2015-0-4-3-21>
30. Osintseva E. V. Trends for development of reference material list in the Russian Federation. In: *Reference Materials in Measurement and Technology: Proceedings II International Scientific Conference*, 14–18 September 2015, Yekaterinburg, Russia. Yekaterinburg: UNIIM; 2015. P. 68–70. (In Russ.).
31. Studenok V. V., Kremleva O. N. Reference materials in the healthcare and pharmaceutical industries. Mechanisms for planning the necessary range of reference materials. In: *Problems of Metrological Support in Healthcare and the Production of Medical Equipment: Collection of Abstracts of the IX Scientific and Technical Conference*, 26–30 September 2022, Sochi, Russia. Moscow: VNIIOFI; 2019. P. 47–49. (In Russ.).
32. Studenok V. V., Kremleva O. N. Reference materials in the system of metrological assurance of quantitative analysis. *Industrial laboratory. Diagnostics of materials*. 2019;85(1(II)):130–134. (In Russ.). <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2019-85-1-II-130-134>
33. Tarasevich B. N. IR spectra of the main classes of organic compounds. Reference materials. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2012. P. 4–31. (In Russ.).
34. Kupcov A. H., Zhizhin G. N. Fourier transform spectra and infrared absorption spectra of polymers. Directory. Moscow: Fizmatlit; 2001. P. 26–29. (In Russ.).
35. Baibing L., Julian M., Elaine B. M. Generalized partial least squares regression based on the penalized minimum norm projection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2004;72(1):21–26. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.01.026>
36. Kuleshova S. I. Testing activity of antibiotics by agar diffusion. *Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products Bulletin*. 2015;(3):13–17. (In Russ.).
37. Dwi W. A., Dwi A. R., Muhtar P. A., Haryanto A., Fitriana I. Validation method for determining enrofloxacin and tylosin levels in broiler liver, kidney, and muscle using high-performance liquid chromatography. *Veterinary World*. 2022;15(2):268–274. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.268-274>

38. Blackwell P. A., Lützhøft H.-Ch. H., Ma H.-P., Halling-Sørensen B., Boxall A., Kay P. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2004;1045(1–2):111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.063>
39. Shokhina O. S., Medvedevskikh M. Yu., Krasheninina M. P., Makarova S. G., Krylov A. I., Tkachenko I. Yu. et al. Development of the state secondary measurement standard and certified reference materials for composition on the basis of liquid and gas chromatography. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2017;13(1):9–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.20915/2077-1177-2017-13-1-9-26>

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- European Pharmacopoeia. 10th Ed. Version 1.7.0. [сайт]. URL: <https://pheur.edqm.eu/home> (дата обращения 17.10.2022).
- The United States Pharmacopeia (USP-NF) [сайт]. URL: https://www.uspnf.com/?_ga=2.152377017.1610502470.1668417205-1574086427.1658212481. (дата обращения 17.10.2022).
- Ветеринарные препараты. URL: <https://vetsnab.info/veterinarnye-preparaty/> (по состоянию на 15 июля 2022).
- ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений = State system for ensuring the uniformity of measurements. Procedures of measurements. М. : Стандартинформ, 2019. 16 с.
- ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации) = Reference materials. General and statistical principles for certification. М. : Стандартинформ, 2017. 58 с.
- ГОСТ 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения = State system for ensuring the uniformity of measurements. Reference materials of composition and properties of substances and materials. Basic principles. М. : Стандартинформ, 2019. 34 с.
- Государственная Фармакопея Российской Федерации: XIV издание. В 4 т. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. URL: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/xiv-izdanie-gosudarstvennoy-farmakopei-rossiyskoy-federatsii>
- Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения // Гален 2.5.7. URL: <https://galen.vetr.ru/#/registry/pharm/registry?page=1> (по состоянию на 15 июля 2022).
- Государственный реестр ветеринарных препаратов и кормовых добавок Республики Казахстан. URL: <https://www.gov.kz/memleket/entities/moa/documents/details/12060?lang=ru>. (по состоянию на 13 октября 2022 года)
- МУ А-1/063 Методика измерений содержания тилозина в субстанции тилозина тартрата микробиологическим методом // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16/items/1010594> (дата обращения 17.10.2022).
- Об обеспечении единства измерений: Федер. закон Рос. Федерации от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собрания Рос. Федерации 11 июня 2008 г.: одобрен Советом Федерации Федер. Собр. Рос. Федерации 18 июня 2008 г. (в редакции от 11 июня 2021 г. № 170-ФЗ) // Официальный интернет-портал правовой информации [сайт]. URL: <http://pravo.gov.ru/proxy/ips/?docbody=&firstDoc=1&lastDoc=1&nd=102122832> (дата обращения: 09.09.2022)
- Об утверждении Порядка аттестации первичных референтных методик (методов) измерений, референтных методик (методов) измерений и методик (методов) измерений и их применение: Приказ Министерства промышленности и торговли РФ от 15.12.2015 № 4091 // Официальный интернет-портал правовой информации [сайт]. <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201602260008> (дата обращения 17.10.2022).
- ОФС.1.2.1.1.0002.15 Спектрометрия в инфракрасной области // Государственная Фармакопея Российской Федерации: XIII издание. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea13>
- ОФС.1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография // Государственная Фармакопея Российской Федерации: XIII издание. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea13>
- РМГ 93 - 2015 Государственная система обеспечения единства измерений. Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов = State system for ensuring the uniformity of measurements. Estimation of metrological characteristics of reference materials. М.: Стандартинформ, 2016. 27 с.
- ТР ТС 021/2011 О безопасности пищевой продукции. Утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 декабря 2011 года № 880 (в редакции от 14 июля 2021 г. № 170-ФЗ) // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [сайт]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/902320560> (дата обращения 17.10.2022).
- ТР ТС 034/2013 О безопасности мяса и мясной продукции». Утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 № 68 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [сайт]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/499050564> (дата обращения 17.10.2022).
- Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений [сайт]. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry> (дата обращения 17.10.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гуляева Анастасия Юрьевна – канд. биол. наук, заместитель заведующего отделом контроля за безопасностью обращения фармакологических лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ»

Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.

e-mail: a.gulyaeva@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6493-9701>

Хрущев Алексей Юрьевич – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории контроля качества лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ»

Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.

e-mail: a.hrushev@vgnki.ru

Researcher ID: AAD-5363–2019

Колячкина Светлана Викторовна – канд. хим. наук, заместитель заведующего отделом контроля за безопасностью обращения фармакологических лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ»

Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.

e-mail: s.kolyachkina@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5523-171X>

Муравьева Виктория Борисовна – канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории контроля качества лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ»

Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.

e-mail: v.muravieva@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5395-9579>

Антонова Светлана Владимировна – канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории контроля качества лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ»

Россия, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5.

e-mail: s.antonova@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0886-4578>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasia Yu. Gulyaeva – Cand. Sci. (Biol.), Deputy Head of the department for pharmaceutical medicines safety control (VGNKI)

5 Zvenigorodskoye highway, Moscow, 123022, Russia.

e-mail: a.gulyaeva@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6493-9701>

Alexei Y. Khrushchev – Cand. Sci. (Chem.), Leading Researcher of the laboratory for quality control of medicines (VGNKI)

5 Zvenigorodskoye highway, Moscow, 123022, Russia.

e-mail: a.hrushev@vgnki.ru

Researcher ID: AAD-5363–2019

Svetlana V. Kolyachkina – Cand. Sci. (Chem.), Deputy Head of the department for pharmaceutical medicines safety control (VGNKI)

5 Zvenigorodskoye highway, Moscow, 123022, Russia.

e-mail: s.kolyachkina@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5523-171X>

Victoria B. Muravieva – Cand. Sci. (Vet.), Leading Researcher of the laboratory for quality control of medicines (VGNKI)

5 Zvenigorodskoye highway, Moscow, 123022, Russia.

e-mail: v.muravieva@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5395-9579>

Svetlana V. Antonova – Cand. Sci. (Chem.), Leading Researcher of the laboratory for quality control of medicines (VGNKI)

5 Zvenigorodskoye highway, Moscow, 123022, Russia.

e-mail: s.antonova@vgnki.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0886-4578>