



УДК 636.085.3:577.18:543

ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В МОЛОКЕ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ



А. И. Коротков^{1,2}, В. Г. Амелин²

¹Брянская межобластная ветеринарная лаборатория

²Владимирский государственный университет

Предложен способ определения антибиотиков тетрациклинового ряда (тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина, доксициклина) в молоке методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с трехквадрупольным (ВЭЖХ-МС/МС/МС) и тандемным квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим (ВЭЖХ-МС/ВП) детекторами, с простой и экспрессной пробоподготовкой. Диапазоны определяемых содержаний тетрациклинов при навеске молока 1 г составили 1–200 мкг/кг. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 7%. Продолжительность анализа 30–40 мин.

Ключевые слова: тетрациклины, молоко, масс-спектрометрия высокого разрешения, трехквадрупольная масс-спектрометрия, тандемная квадруполь-времяпролетная масс-спектрометрия.

Rapid Determination of Tetracyclines in Milk by the Method of Mass Spectrometry High Resolution

A. I. Korotkov, V. G. Amelin

The method of determination of tetracycline antibiotics (tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline, doxycycline) in the milk of methods HPLC-MS/MS/MS and HPLC-QTOF-MS, with a simple and rapid sample preparation. The ranges defined concentrations of tetracyclines in milk sample of 1 g was 1–200 µg/kg. Relative standard deviation of the results of the analysis does not exceed 7%. The analysis duration 30–40 minutes.

Key words: tetracycline, milk, high resolution mass spectrometry, HPLC-MS/MS/MS, HPLC-QTOF-MS.

Введение

Антибиотики тетрациклиновой группы применяют для лечения инфекционных заболеваний у животных, поэтому остаточные их количества могут встречаться в пищевых продуктах животного происхождения [1]. Употребление в пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, негативно сказывается на организме человека, в связи с этим их содержания нормируются [2].

В настоящее время предложены различные варианты определения тетрациклинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым [3, 4], диодно-матричным [5–7] и масс-спектрометрическим [8, 9] детекторами. В предложенных методиках для извлечения тетрациклинов из молока используют буферный раствор Маклвейна с ЭДТА, а затем проводят очистку и концентрирование экстракта мето-

дом твердофазной экстракции [3–7, 9]. Однако данные способы длительны и трудоемки, что не позволяет контролировать большого количества проб в короткие сроки.

В данной работе рассматривается сочетание простой и быстрой пробоподготовки с определением тетрациклинов в молоке методами масс-спектрометрии высокого разрешения: ВЭЖХ-МС/МС/МС и ВЭЖХ-МС/ВП.

Экспериментальная часть

Аппаратура. В работе использовали жидкостной хроматограф «UltiMate 3000» (Thermo Scientific, США) с трехквадрупольным детектором «Qtag 4000» (ABSciex, Германия) (метод А) и тандемным квадруполь-времяпролетным «maXisimpact» (Bruker, Германия) (метод Б) масс-спектрометрическим детектором. Разделение проводили на колонке (150×2.1 мм) Acclaim 120 C18 (3 мкм) (ThermoScientific, США) (метод А) и (100×2.1 мм) Acclaim 120 C8 (3 мкм) (ThermoScientific, США) (метод Б) в режиме градиентного элюирования подвижной фазы. Между хроматографической колонкой и системой ввода образца в двух системах была установлена предколонка (10×2 мм) Acclaim 120 C18 (5 мкм), позволяющая переключать поток на слив и хроматографическую колонку.

Реактивы. Использовали стандартные образцы антибиотиков: тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина и доксициклина (Fluka, Германия), демеклоциклина (Sigma, Германия). Исходные стандартные растворы с концентрацией 10 мкг/мл готовили растворением навески препаратов в метаноле. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных деионированной водой. Использовали метанол, ацетонитрил, муравьиную кислоту, н-гексан, трихлоруксусную кислоту (Merck, Германия).

Условия хроматографического разделения и детектирования. Использовали подвижную фазу, состоящую из 0.5%-ной муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрил/метанол (50/50) (В). Градиент подвижной фазы представлен в табл. 1. Температура колонки 40 °С, объем вводимой пробы 50 мкл (метод А) и 20 мкл (метод Б).



Таблица 1

Градиент подвижной фазы для двух методов

Метод А			Метод Б		
Время, мин	Скорость потока, мл/мин	В, %	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	В, %
0	0.25	0	0	0.4	0
0.3	0.25	0	2	0.4	0
0.5	0.5	0	7	0.4	100
2.0	0.5	100	7.8	0.4	100
3.5	0.5	100	7.9	0.4	0
3.8	0.5	0	9	0.2	0
5.0	0.25	0	10	0.2	0

Трехкврупольный масс-спектрометрический детектор «Qtrap 4000» использовали в режиме MRM (мониторинг множественных реакций), детектировали по два фрагмента каждого аналита. Была выбрана положительная полярность ионов, температура нагревателей электроспрейного ионного источника установлена на 500°C, а потенциал на 5000 В, заданы следующие значения параметров: поток встречного газа – 1.70 атм, поток газа-распылителя – 2.72 атм, поток газа нагревателя – 3.40 атм.

Тандемный квадруполь-времяпролетный масс-спектрометрический детектор «maXisim-rast» был настроен на выделение квадрупольного диапазона масс и его фрагментацию, детектировали спектр фрагментов от выделенного диа-

пазона масс. При обработке данных выделяли хроматограммы фрагментов тетрациклинов с точностью ± 5 мДа. Была выбрана масса 462,44 Да и задано окно изоляции массы 60 Да, энергия фрагментации 24 эВ, установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на щитке капилляра – 320 В, на капилляре – 1650 В, давление газа-распылителя – 4,76 атм, поток газа-осушителя азота – 6 л/мин, температура газа-осушителя – 150°C, поток газа-испарителя азота – 250 л/час, температура газа-испарителя – 350°C, время трансфера ионов – 45 мс, время задержки перед импульсом – 11 мс. Индивидуальные настройки масс-спектрометрических детекторов для каждого аналита приведены в табл. 2.

Таблица 2

Настройки масс-спектрометрических детекторов

Метод А

Аналит	Количественный анализ				Идентификация				t_R , мин
	Переход, m/z	ПД, В	ЭС, эВ	ВПС, В	Переход, m/z	ПД, В	ЭС, эВ	ВПС, В	
Хлортетрациклин	479.09 – 443.9	71	31	12	479.09 – 461.9	71	25	12	3.85
Тетрациклин	445.15 – 410.0	56	27	12	445.15 – 427.9	56	23	12	3.70
Окситетрациклин	461.15 – 426.0	61	27	12	461.15 – 444.2	61	19	12	3.67
Докситетрациклин	445.12 – 428.0	61	25	12	445.12 – 409.9	61	35	10	3.92
Демеклоциклин	465.07 – 447.9	66	25	12	465.07 – 429.9	66	31	12	3.77

Метод Б

Аналит	m/z для количественного анализа	m/z для идентификации	t_R , мин
Хлортетрациклин	444.0843	462.0955	5,5
Тетрациклин	410.1246	428.1347	5.1
Окситетрациклин	426.1182	444.1288	5.1
Доксициклин	428.1343	410.1244	5.7
Демеклоциклин	448.0779	430.0672	5.3

Примечание. ПД – потенциал декластеризации, ЭС – энергия соударений, ВПС – выходной потенциал ячейки соударений.



Пробоподготовка. Отбирали 1,0 г молока в центрифужную пробирку емкостью 15 мл. Добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (демеклоциклин с концентрацией 1мкг/мл), добавляли 250 мкл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешали и центрифугировали 15 мин при 3750 об/мин. Полученный экстракт переносили в центрифужную пробирку емкостью 15 мл и добавили 2 мл н-гексана. Встряхивали 30 с и после расслаивания фаз нижний слой экстракта фильтровали через мембранный фильтр (0.45 мкм) в микрофлакон для хроматографирования.

Результаты и их обсуждение

Тетрациклин и доксициклин обладают идентичными материнскими массами и массами фрагментных ионов. Отличить их можно лишь по

времени выхода и по различному соотношению интенсивностей фрагментных ионов. В режиме MRM при достаточном хроматографическом разделении это не вызывает проблем благодаря возможности подбора оптимальной энергии фрагментации для каждого фрагментного иона. Однако на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометрическом детекторе использование режима MRM приводило к значительной потере чувствительности. Для него был применен прием выбора диапазона масс, его фрагментации и детектирования спектра фрагментов. На рис. 1 представлена хроматограмма извлеченных масс из хроматограммы по общему ионному току экстракта из молока смеси тетрациклинов для «Qtrap 4000» (а) и «maXisimpact» (б), на рис. 2 представленные масс-спектры антибиотиков тетрациклиновой группы.

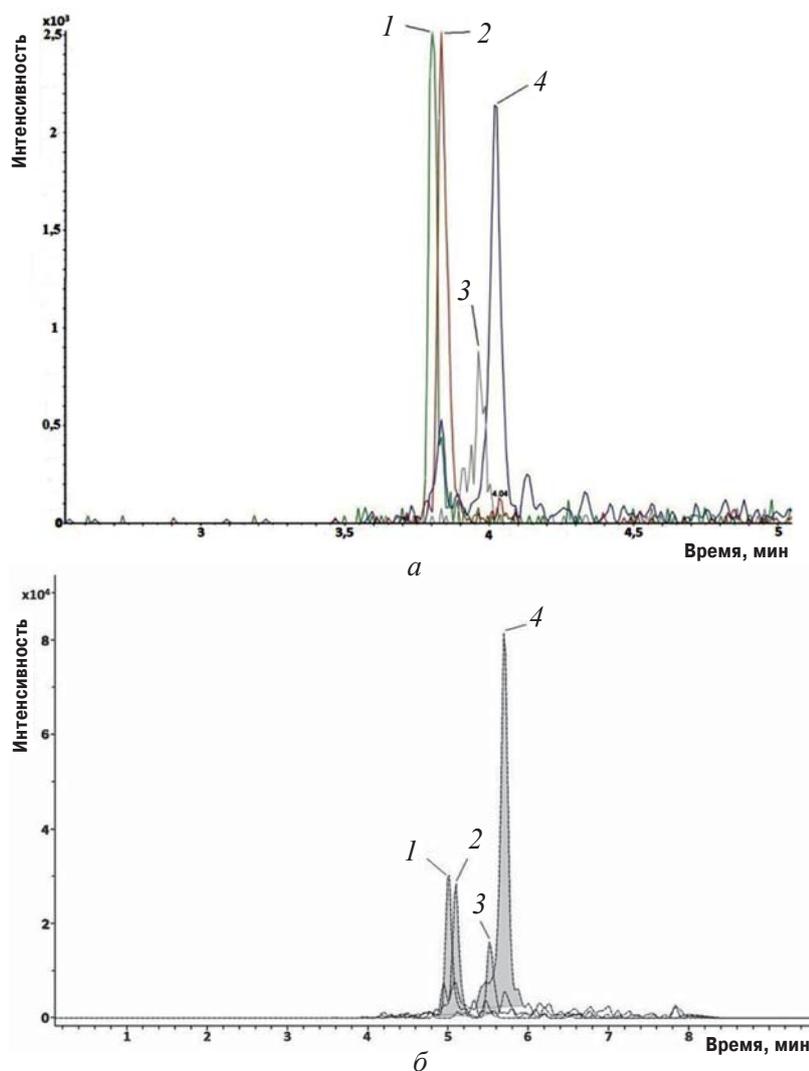


Рис. 1. Хроматограммы извлеченных масс-тетрациклинов для «Qtrap 4000» (а) и «maXisimpact» (б): 1 – тетрациклин $m/z = 410.0$ (а), $m/z = 410.1246$ (б), 2 – окситетрациклин $m/z = 426.0$ (а), $m/z = 426.1182$ (б), 3 – хлортетрациклин $m/z = 443.9$ (а), $m/z = 444.0843$ (б), 4 – доксициклин $m/z = 428.0$ (а), $m/z = 428.1343$ (б)

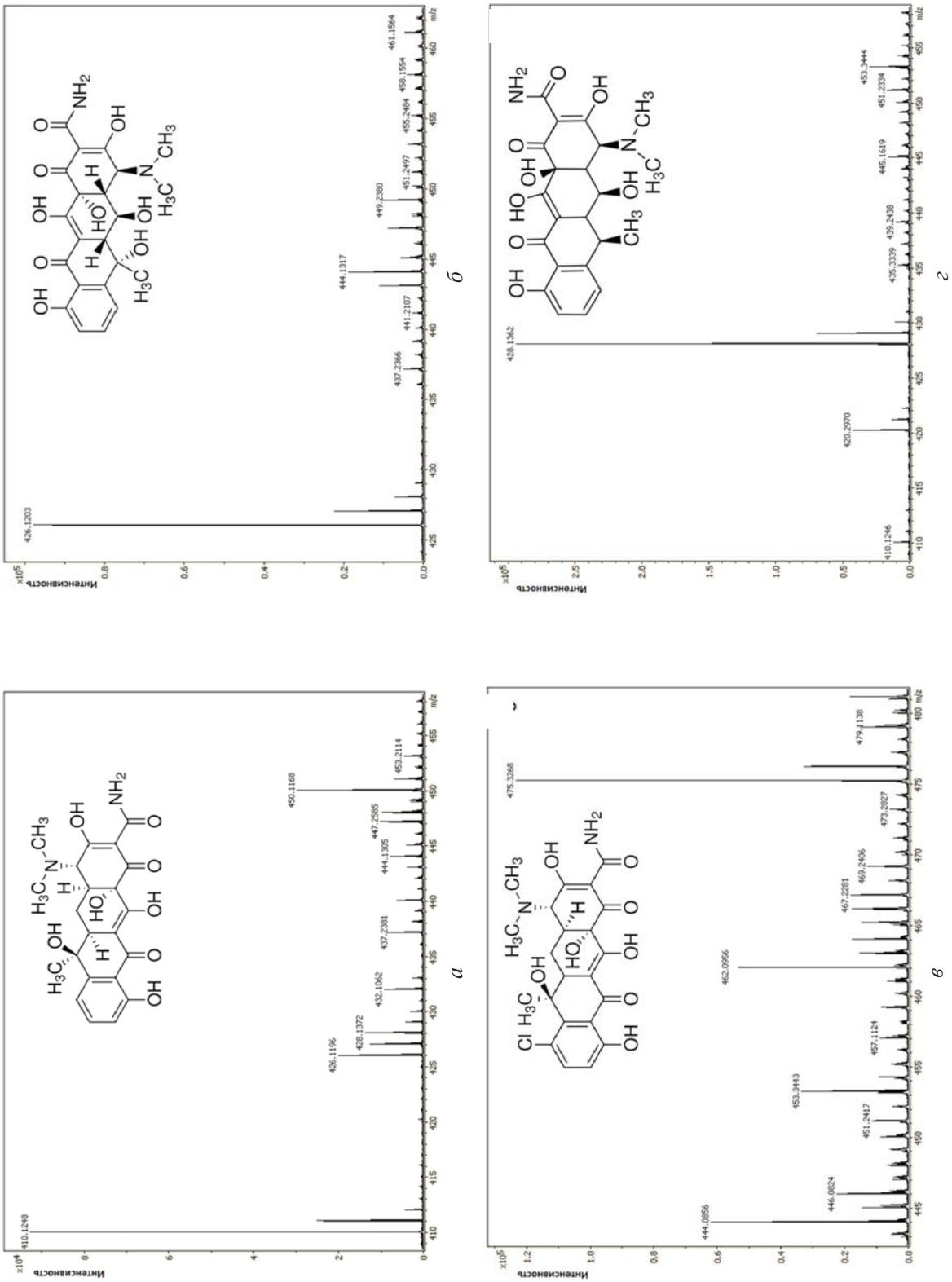


Рис. 2. Масс-спектры: а – тетрациклина, б – окситетрациклина, в – хлортетрациклина, г – доксициклина



В табл. 3 представлены степени извлечения тетрациклинов из молока на четырех уровнях добавок 1, 5, 10, 15 мкг/кг для двух детекторов.

Установлено, что степень извлечения антибиотиков в зависимости от уровня добавки колеблется от 92 до 111%.

Таблица 3

Степень извлечения тетрациклинов из молока для различных добавок ($n = 3$)

Антибиотик	Средний коэффициент извлечения, %			
	1 мкг/кг	5 мкг/кг	10 мкг/кг	15 мкг/кг
Метод А				
Хлортетрациклин	107.2	95.9	97.2	97.5
Тетрациклин	102.8	94.6	98.7	98.3
Окситетрациклин	110.5	96.4	95.5	94.9
Доксициклин	104.8	96.6	98.0	97.5
Метод Б				
Хлортетрациклин	106.7	103.8	99.8	98.3
Тетрациклин	102.5	109.4	108.8	106.9
Окситетрациклин	106.8	103.8	104.7	99.5
Доксициклин	100.3	98.6	96.9	92.9

В табл. 4. представлены аналитические характеристики методики определения тетрациклинов. Коэффициент корреляции градуировочных характеристик для всех рассматриваемых тетрациклинов в диапазоне 1–200 мкг/мл ≥ 0.99 . Пределы обнаружения (c_{min}) и пределы определения (c_n) рассчитаны при отношении сиг-

нал/шум равном 3 и 10. Пределы обнаружения антибиотиков при массе навески 1 г в зависимости от аналита составили для «Qtrap 4000» 0.08–0.23 мкг/кг, для «maXisimpact» 0.01–0.05 мкг/кг. Диапазоны определяемых содержаний для «Qtrap 4000» и «maXisimpact» 1–200 мкг/кг, при навеске пробы 1 г.

Таблица 4

Аналитические характеристики методик определения тетрациклинов

Антибиотик	t_R , мин	Уравнение градуировочного графика	R^2	c_{min} , мкг/кг	c_n , мкг/кг
Метод А					
Хлортетрациклин	3,8	$y = -0.032x^2 + 1.27x - 0.00408$	0.9993	0.12	0.4
Тетрациклин	3,7	$y = -0.13x^2 + 1.98x - 0.00218$	0.9987	0.15	0.5
Окситетрациклин	3,7	$y = -0.128x^2 + 2.28x - 0.00581$	0.9977	0.08	0.3
Доксициклин	3,8	$y = -0.126x^2 + 2.35x - 0.00533$	0.9985	0.23	0.8
Метод Б					
Хлортетрациклин	5,5	$y = -0.120x^2 + 0.973x - 0.0019$	0.9999	0.05	0.2
Тетрациклин	5,1	$y = -0.116x^2 + 1.426x - 0.0030$	0.9990	0.03	0.1
Окситетрациклин	5,0	$y = -0.080x^2 + 1.515x - 0.0001$	0.9996	0.01	0.03
Доксициклин	5,7	$y = -0.171x^2 + 3.011x - 0.0071$	0.9995	0.02	0.05

Список литературы

1. *Машковский М. Д.* Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2005. С. 842–850.
2. СанПиН 2.3.2.2804-10 «Дополнения и изменения № 22 к СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»». М., 2005.
3. *Navratilova P., Borkovcova I., Drackova M., Janstova B., Vorlova L.* Occurrence of tetracycline, chlortetracyclin and oxytetracycline residues in raw cow's milk // Czech J. Food Sci. 2009. Vol. 27, № 5. P. 379–385.



- Zhou J., Xue X., Li Y., Zhang J., Chen F., Wu L., Chen L., Zhao J. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction // *Food Chem.* 2009. Vol. 115. P. 1074–1080.
- Cinquina A. L., Longo F., Anastasi G., Giannetti L., Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle // *J. Chromatogr. A.* 2003. Vol. 987. P. 277–233.
- Fritz J. W., Zuo Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography // *Food Chem.* 2007. Vol. 105. P. 1297–1301.
- Mamani M. C. V., Reyes F. G. R., Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD // *Food Chem.* 2009. Vol. 117. P. 545–552.
- De Ruyck H., De Ridder H. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *Rap. Com. Mass Spec.* 2007. Vol. 21, № 9. P. 1511–1520.
- Bruno F., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., Pallagrosi M. An original approach to determination traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry // *Rap. Com. MassSpec.* 2002. № 16. P. 1365–1376.

УДК 546.661:543.426

ВОЗМОЖНОСТИ СТАЦИОНАРНОЙ И РАЗРЕШЕННОЙ ВО ВРЕМЕНИ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ НЕКОТОРЫХ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В МИЦЕЛЛЯРНЫХ СРЕДАХ

Т. Д. Смирнова, И. И. Паращенко, Е. А. Желобницкая

Саратовский государственный университет
E-mail: Smirnovatd@mail.ru



Изучены особенности влияния природы второго лиганда, мицелл ПАВ на интенсивность сенсibilизированной флуоресценции хелатов европия (III) с некоторыми производными тетрациклина. Предложен подход к флуориметрическому определению суммы трех тетрациклинов и повышению избирательности, заключающийся в измерении интенсивности эмиссии хелатов с помощью стационарной и разрешенной во времени флуоресценции. Установлено оптимальное время задержки измерения сигнала, 100 мкс, позволяющее максимально увеличить соотношение интенсивностей флуоресценции разнолигандных хелатов европия (III) в мицеллярных средах цетилпиридиния определяемых и мешающих антибиотиков.

Ключевые слова: сенсibilизированная флуоресценция, тетрациклины, мицеллярные среды, время жизни сенсibilизированной флуоресценции.

Possible Stationary and Time-resolved Sensitized Fluorescence in Defining Some of Tetracycline Micellar Media

T. D. Smirnova, I. I. Parashchenko, E. A. Zhelobitskaya

The features of the influence of the nature of the second ligand, surfactant micelles on the intensity of sensitized fluorescence chelates of europium (III) with some derivatives of tetracycline. Based on the results of the study fluorimetric properties and decay kinetics of the fluorescence ternary complexes proposed approaches to determining the amount of three tetracyclines and tetracycline improve selectiv-

ity in determining the presence of doxycycline and oxytetracycline by measuring the fluorescence signal with a resolution in time. The optimal delay time, 100 ms, to maximize the ratio of emission intensity of ternary chelates of europium (III) in micellar media cetylpyridinium determined and interfering with antibiotics.

Key words: sensitized fluorescence, tetracyclines, micellar environment, lifetime of the sensitized fluorescence.

Антибиотики тетрациклинового ряда широко используются в клинике, пищевой промышленности в качестве консервантов мяса, овощей, фруктов, молока. Их применение в рыбном хозяйстве, птицеводстве в процессе лечения и стимуляции роста животных является одной из причин присутствия остаточных концентраций токсичных биологически активных веществ в пищевых продуктах. Микросодержания антибиотиков необходимо контролировать, так как они вызывают резистентность и различные хронические заболевания потребителей [1]. Кроме того, ингибирующие вещества оказывают влияние на микробиологические процессы кисломолочного производства, что приводит к изготовлению недоброкачественной или даже опасной продукции. Современный рынок и громадный оборот пищевых продуктов между странами нуждается