

МЕТОДИКА КОНТРОЛЯ ОСТАТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ АНТИБИОТИКОВ ПЕНИЦИЛЛИНОВОЙ ГРУППЫ В ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Е. И. Полянских, А. Г. Полоневич, Л. Л. Бельшева*

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», г. Минск,
Республика Беларусь, *e-mail: gannapalanevich@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2017 г.

Разработана методика одновременного определения остаточного содержания восьми антибиотиков группы пенициллина в продукции животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Выделение аналитов из пищевой матрицы включает жидкостную экстракцию смесью воды и ацетонитрила, очистку от липидов гексаном и твердофазную экстракцию. Разделение определяемых соединений проводят на обращеннофазной колонке в режиме градиентного элюирования, количественное определение – по матричной калибровке методом внутреннего стандарта. Диапазон определяемых концентраций для каждого пенициллина в молоке и молочной продукции – от 2 до 100 мкг/кг, в мясе и мясных продуктах – от 10 до 800 мкг/кг.

Ключевые слова: пенициллины, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрическое детектирование, экстракция, твердофазная экстракция, продукты питания животного происхождения.

ВВЕДЕНИЕ

Пенициллины представляют собой сложные соединения, содержащие в своей структуре β -лактамное и тиазолидиновое кольца, относятся к бета-лактамным антибиотикам. Бета-лактамные антибиотики нашли широкое применение в медицинской практике, так как обладают надежностью, относительно широким спектром антимикробного действия, высокой активностью, стабильностью и эффективностью. Механизм антибактериального действия пенициллинов заключается в блокировании конечной стадии синтеза стенки бактерий, в результате чего происходит лизис клетки. Благодаря хорошим антимикробным свойствам, антибиотики пенициллиновой группы широко используются в ветеринарии для лечения и профилактики заболеваний. Однако введение антибиотиков сельскохозяйственным животным может привести к загрязнению ими пищевых продуктов. Употребление такой продукции приводит к изменению кишечной микрофлоры человека, размножению патогенных микробов, возникновению аллергических заболеваний [1, 2]. В Республике Беларусь и в Таможенном Союзе в соответствии с санитарно-гигиеническими требованиями установлены

максимально допустимые уровни остаточного содержания пенициллинов в пищевых продуктах.

Так, в молоке и продуктах переработки молока содержание пенициллина G, ампициллина и амоксициллина не должно превышать 4 мкг/кг, диклоксациллина, клоксациллина, оксациллина и нафциллина – 30 мкг/кг. В мясе, печени, почках и жире всех видов убойных животных установлены следующие максимально допустимые уровни содержания: 50 мкг/кг для пенициллина G, ампициллина, амоксициллина, 300 мкг/кг для диклоксациллина, клоксациллина, оксациллина и нафциллина, 25 мкг/кг для пенициллина V в свинине и домашней птице [3-5]. Структурные формулы, молекулярные формулы и молярные массы восьми контролируемых пенициллинов приведены на рисунке 1.

Для разных продуктов питания используют различные методики определения антибиотиков пенициллиновой группы, в которых способы подготовки проб обусловлены природой пищевой матрицы и структурой извлекаемых пенициллинов. В целом процедура подготовки проб должна включать стадию выделения антибиотиков из пищевой матрицы и стадию очистки экстракта. Для выделения пенициллинов, согласно литературным данным, в основном используют фосфатные буферные растворы с показателем рН в диапазоне 6,5 – 9,2 и полярный органический растворитель ацетонитрил, так как в структуре пенициллинов присутствуют полярные функциональные группы, обуславливающие гидрофильные свойства данных аналитов. Согласно опубликованным данным, не рекомендуется использовать сильно кислые растворы для выделения пенициллинов из пищевых матриц и осаждения молочных белков, так как это способствует деструкции рассматриваемых антибиотиков с образованием пенициллиновой кислоты. Деструкция пенициллинов также может происходить при взаимодействии с метанолом. При анализе пищевых продуктов с большим содержанием липидов для обезжиривания проб используют различные приемы: вымораживание, центрифугирование, экстракцию липидов неполярными органическими растворителями [6-14].

Таким образом, целью настоящей работы явилась разработка унифицированной, воспроизводимой и высокочувствительной методики одновременного определения остаточных количеств восьми антибиотиков пенициллиновой группы (амоксициллина (AMOXI), ампициллина (AMPI), пенициллина G (PCN G), пенициллина V (PCN V), оксациллина (OXA), клоксациллина (CLOX), нафциллина (NAF) и диклоксациллина (DICLOX)) в продукции животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), соответствующей санитарно-гигиеническим требованиям Республики Беларусь и Таможенного Союза.

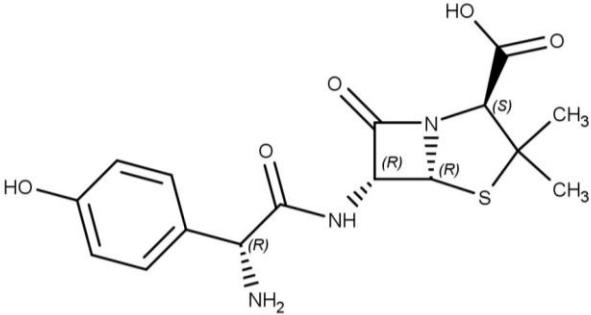
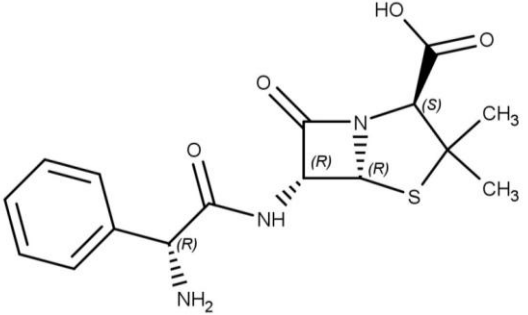
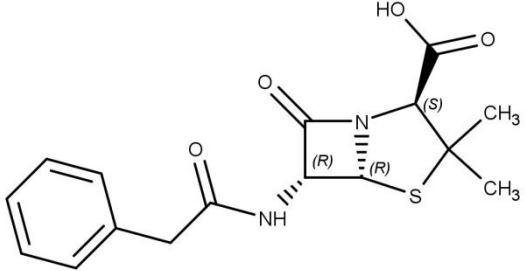
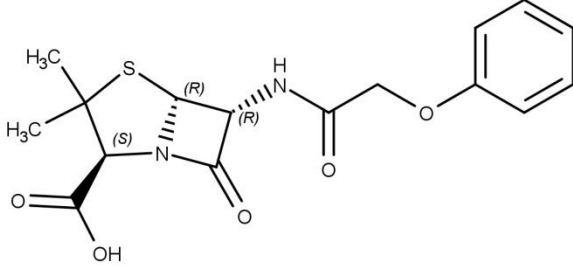
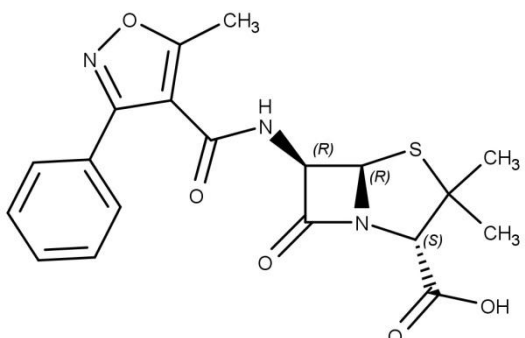
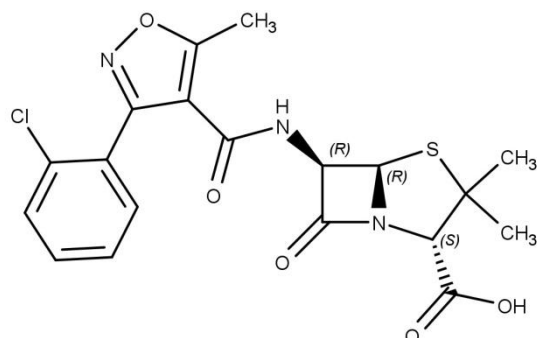
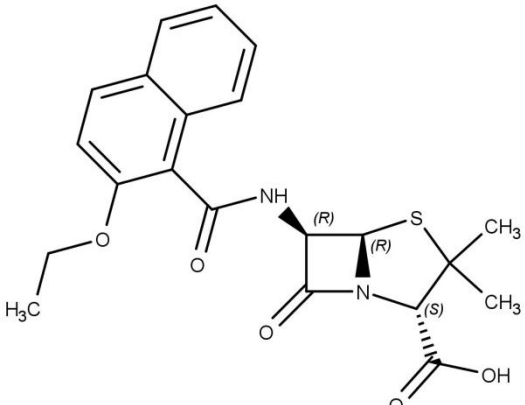
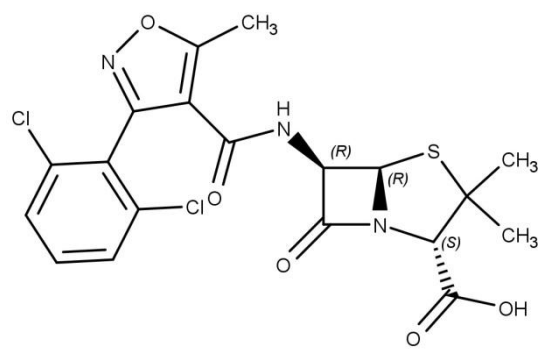
<p>Амоксициллин $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ $M = 365,4$ г/моль</p> 	<p>Ампициллин $C_{16}H_{19}N_3O_4S$ $M = 349,41$ г/моль</p> 
<p>Пенициллин G $C_{16}H_{18}N_2O_4S$ $M = 334,39$ г/моль</p> 	<p>Пенициллин V $C_{16}H_{18}N_2O_5S$ $M = 350,39$ г/моль</p> 
<p>Оксациллин $C_{19}H_{19}N_3O_5S$ $M = 401,44$ г/моль</p> 	<p>Клоксациллин $C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$ $M = 435,88$ г/моль</p> 
<p>Нафциллин $C_{21}H_{22}N_2O_5S$ $M = 414,48$ г/моль</p> 	<p>Диклоксациллин $C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_5S$ $M = 470,33$ г/моль</p> 

Рис. 1. Структурные формулы определяемых антибиотиков группы пенициллина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы, материалы и оборудование. В качестве стандартных образцов использовали амоксициллина тригидрат (содержание основного вещества 98,7%), ампициллина тригидрат (99,7%), пенициллина G калиевую соль (99,6%), пенициллина V калиевую соль (98,9%), оксациллина натриевой соли моногидрат (99,2%), клоксациллина натревой соли моногидрат (98,5%), нафциллина натриевую соль (99,4%), диклоксациллина натревой соли гидрат (99,0%) и пенициллина G-d7 N-этилпиперидиновую соль (98,0%) производства фирмы «Sigma-Aldrich».

В работе использовали ацетонитрил и метанол для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$) производства «Sigma-Aldrich», *n*-гексан для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$) производства «Panreac»; натрия дигидрофосфат 2-водный ($\geq 99,0\%$) и натрия гидрофосфат 2-водный ($\geq 99,5\%$) производства «Applichem», муравьиную кислоту ($\geq 98\%$) производства «Acros Organics», натрия гидроксид (ч.д.а.). Деионизованную воду получали с помощью системы очистки воды Easy pure II RF/UV (D7035).

Использовали следующие картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ): Cromabond HR-X 60 мг и Cromabond C₁₈ 500 мг производства «Macherey-Nagel», Oasis HLB 60 мг и Oasis HLB 150 мг производства «Waters», Agilent OPT 60 мг производства «Agilent Technologies».

Условия хроматографирования изучали на колонках Zorbax SB C₁₈ (2,1 x 150 мм, зернение 3,5 мкм), Zorbax SB C₈ (2,1 x 150 мм, 3,5 мкм), Zorbax Eclips Plus C₁₈ (3,0 x 100, 1,8 мкм) и Zorbax Eclips Plus C₈ (3,0 x 100, 1,8 мкм) производства фирмы «Agilent Technologies».

Фильтрацию проб перед проведением ВЭЖХ-МС/МС анализа осуществляли с помощью мембранных шприцевых фильтров (13 мм, 0,2 мкм) из регенерированной целлюлозы («Agilent Technologies»).

Количественное определение проводили с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6410 (фирма «Agilent Technologies»).

Приготовление стандартных растворов. Все стандартные растворы пенициллинов готовили в воде. Основные стандартные растворы с концентрацией 1,0 мг/см³ готовили для каждого аналита индивидуально и хранили замороженными при температуре (20 ± 5)°С. Рабочие стандартные растворы смеси пенициллинов с концентрациями 10 и 1 мкг/см³, 100, 50 и 10 нг/см³ готовили непосредственно перед проведением исследований. Рабочий раствор внутреннего стандарта пенициллина G-d7 N-этилпиперидиновой соли концентрацией 1 мкг/см³ также готовили непосредственно перед проведением исследований.

Подготовка проб. Навески гомогенизированных продуктов массой 1,00 г взвешивали в полипропиленовых пробирках объемом 50 см³ и вносили рабочий раствор внутреннего стандарта: 0,05 см³ для молочных продуктов и 0,10 см³ для мясных продуктов. По прошествии 10 минут к содержимому пробирок приливали 2 см³ дистиллированной воды и тщательно перемешивали, затем добавляли 10 см³ ацетонитрила и помещали на 10 минут на электровстряхиватель. Далее пробы центрифугировали при 10000 об/мин в

течение 10 минут при температуре 5°C. Супернатант переносили в новые полипропиленовые пробирки, помещали на нагревательный модуль и упаривали ацетонитрильный экстракт в токе воздуха при 40°C до удаления органического растворителя. К полученному остатку приливали 5 см³ фосфатного буферного раствора с рН 6,5 и 5 см³ гексана, встряхивали в течение 5 мин. Далее содержимое пробирок оставляли в покое для достижения межфазного равновесия. Гексановую фракцию отбрасывали, оставшийся водный экстракт оставляли для дальнейшей очистки методом твердофазной экстракции.

Очистка и концентрирование методом твердофазной экстракции. Полученные водные экстракты очищали на картриджах Oasis HLB (6 см³, 150 мг). Картриджи предварительно кондиционировали 6 см³ метанола и уравнивали 6 см³ деионизованной воды. Далее пропускали экстракты, промывали картриджи 6 см³ деионизованной воды и сушили под вакуумом в течение 10 минут. Затем аналиты элюировали 6 см³ ацетонитрила. Элюат упаривали на нагревательном модуле при 40°C. К остатку приливали 1,0 см³ деионизованной воды, помещали на встряхиватель на 10 минут и затем фильтровали через мембранный шприцевой фильтр в виалу. Полученный раствор использовали для дальнейшего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Условия хроматографического разделения. Разделение определяемых пенициллинов проводили на хроматографической обращеннофазной колонке Zorbax SB C₈ (150 мм × 2,1 мм, зернение 3,5 микрон) в режиме градиентного элюирования. Подвижная фаза А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, подвижная фаза В – ацетонитрил. Условия элюирования, выраженные в процентном содержании подвижной фазы В, следующие: 0 – 11 мин, от 0% до 60%; 11 – 16 мин, 60%; 16 – 17 мин, от 60% до 100%; 17 – 19 мин, 100%; 19 – 20 мин, от 100% до 0%; 20 – 28 мин, 0%. Скорость потока подвижной фазы – 0,3 см³/мин, температура термостата колонки – 40°C, объем вводимой пробы – 20 мкл.

Параметры масс-спектрометрического детектирования. Ионизация электроспреем в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Скорость потока газа десольвации – 560 дм³/час, температура газа десольвации – 350°C, давление на распылителе – 45 psi, напряжение на капилляре – 4000 В. Параметры воздействия на ионы пенициллинов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования пенициллинов в режиме мониторинга множественных реакций с регистрацией положительных ионов

Наименование соединения	Родительский ион, m/z	Дочерние ионы, m/z	Напряжение на фрагменторе, В	Энергия соударений, эВ
Амоксициллин	366,2	349,1 / 114,0	75	2 / 15
Ампициллин	350,2	160,0 / 106,0	95	5 / 15
Пенициллин G	335,2	176,0 / 160,0	80	10 / 15
Пенициллин G-d ₇	342,2	183,2 / 160,1	90	10 / 15

Пенициллин V	351,2	160,1 / 114,1	75	5 / 35
Оксациллин	402,2	243,0 / 160,0	85	10 / 5
Клоксациллин	436,1	277,1 / 160,1	85	10 / 10
Нафциллин	415,2	256,0 / 199,2	95	10 / 5
Диклоксациллин	470,1	311,0 / 160,0	95	10 / 10

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение родительских и дочерних ионов. Ионизацию определяемых соединений осуществляли методом электроспрея (ESI) в режиме регистрации положительно заряженных ионов.

Для определения родительских ионов непосредственно в масс-спектрометрический детектор вводили индивидуальные растворы каждого пенициллина с концентрациями 10 мкг/см^3 и снимали полные масс-спектры. Родительский ион выбирали из наиболее интенсивных сигналов в спектре. В результате для каждого соединения в качестве иона-предшественника была выбрана протонированная молекула $(M-H)^+$.

Чтобы обеспечить эффективную передачу выбранных родительских ионов и исключить при переносе их распад на части с различным соотношением массы к заряду (m/z), изучили влияние величины напряжения на фрагменторе (НФ) на отклик каждого иона-предшественника и установили оптимальные значения НФ.

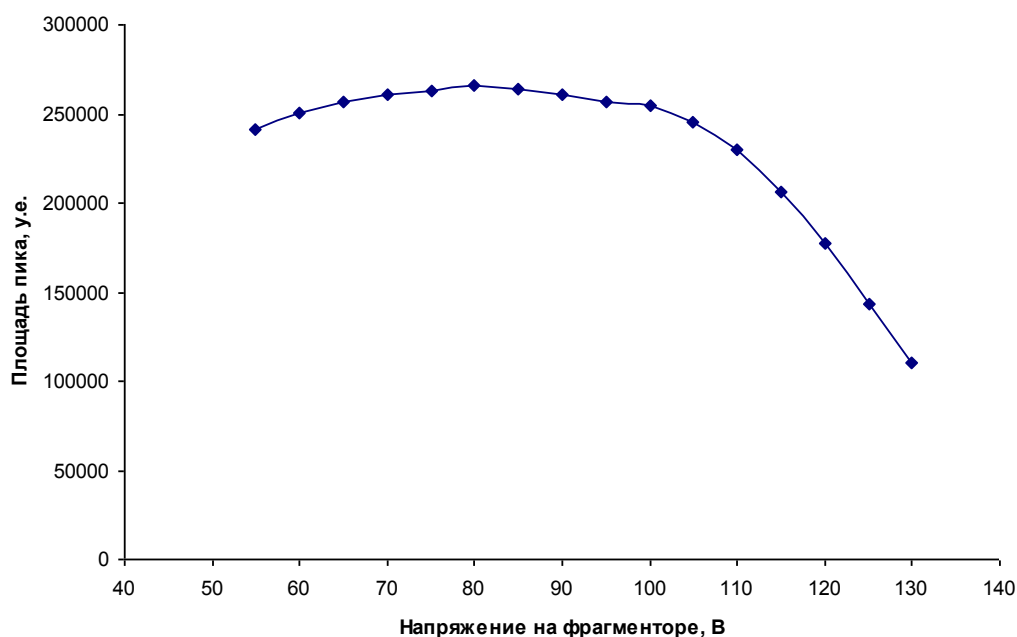


Рис. 2. Влияние напряжения на фрагменторе на интенсивность отклика водного раствора пенициллина G с концентрацией 1 мкг/см^3 .

На рисунке 2 представлена зависимость интенсивности отклика для выбранного родительского иона пенициллина G от напряжения на фрагменторе: максимальный отклик родительского иона достигается при 80 В.

Масс-спектры пенициллина G при оптимальном (80 В) и высоком (160 В) напряжении на фрагменторе представлены на рисунке 3.

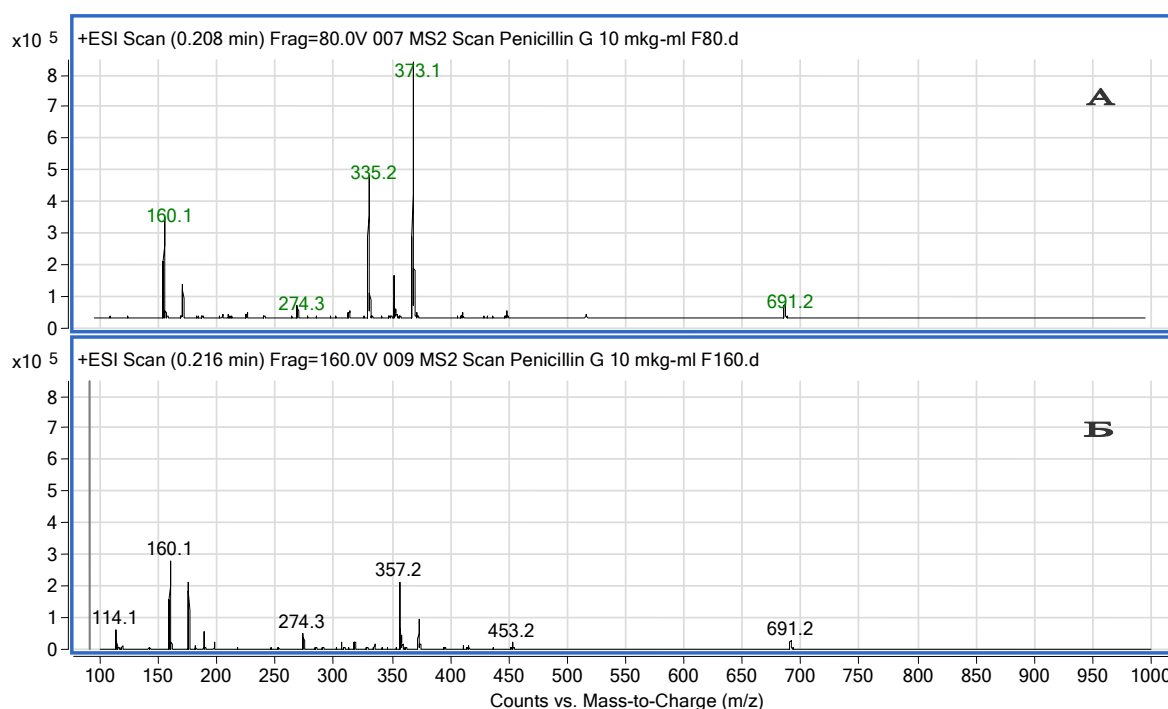


Рис. 3. Масс-спектры раствора пенициллина G при напряжении на фрагменторе 80 В (А) и 160 В (Б).

Из рисунка 3 видно, что при НФ 80 В родительский ион пенициллина G – его протонированная молекула $(M-H)^+$ с отношением массы к заряду m/z 335,2 – является одним из доминирующих ионов. При напряжении на фрагменторе 160 В он уже не регистрируется, так как высокое напряжение приводит к образованию множества ионов с различным соотношением массы к заряду (m/z).

Степень и характер фрагментации родительского иона зависят от энергии соударений (ЭС). Изучено влияние энергии соударений на характер образовавшихся ионов. Для каждого анализа было выделено по три доминирующих дочерних иона и изучено влияние ЭС на величину их отклика. Результаты исследований для пенициллина G представлены в таблице 2: наиболее интенсивные сигналы были получены для дочернего иона с m/z 160,0 при ЭД 5 эВ и для дочернего иона с m/z 176,1, при ЭС 10 эВ. Таким образом, для количественного определения пенициллина G был выбран переход $335,2 \rightarrow 160,0$ (ЭС 5 эВ), для подтверждения достоверности определения пенициллина G использовали соотношение отклика иона m/z 160,0 к отклику иона m/z 176,1.

Таблица 2. Интенсивность отклика дочерних ионов пенициллина G при различных величинах энергии соударений

Дочерний ион пенициллина G, m/z	Энергия соударений, эВ									
	0 эВ	5 эВ	10 эВ	15 эВ	20 эВ	25 эВ	30 эВ	35 эВ	40 эВ	45 эВ
	Интенсивность отклика дочерних ионов пенициллина G, условные единицы площади (у.е.)									
114,0	702	1568	3900	9458	19858	32102	40820	43572	39675	33074
160,0	72186	100144	91319	79597	62431	41066	22715	10921	4541	1790
176,1	40029	80735	88326	76845	60270	40121	22532	10767	4366	1650

Установленные родительские и дочерние ионы, соответствующие значения напряжения на фрагменторе и энергии соударения для всех определяемых соединений представлены в таблице 1.

Подбор условий хроматографического разделения. Первоначально были подобраны условия хроматографического разделения 8 пенициллинов на обращеннофазной колонке Zorbax SB C₈ с использованием в качестве подвижной фазы 0,1% раствора муравьиной кислоты (элюент А) и ацетонитрила (элюент В):

- температура термостата колонки 40°C;
- скорость потока подвижной фазы 0,3 см³/мин;
- градиентное элюирование (в процентном содержании подвижной фазы В): 0 – 11 мин, от 0% до 60%; 11 – 16 мин, 60%; 16 – 17 мин, от 60% до 100%; 17 – 19 мин, 100%; 19 – 20 мин, от 100% до 0%; 20 – 28 мин, 0%;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Далее, поскольку в литературе для анализа пенициллинов описано использование водной фазы с различными модификаторами, было изучено влияние состава элюента А на величину отклика аналитов. Для этого работали в ранее установленных условиях хроматографирования, в качестве элюента А использовали: деионизованную воду, 0,1% раствор муравьиной кислоты и 0,1% раствор муравьиной кислоты в 10 мМ растворе формиата аммония. Результаты исследований представлены на рисунке 4.

Установлено, что использование деионизованной воды приводит к увеличению интенсивности откликов большинства пенициллинов по сравнению с 0,1% раствором муравьиной кислоты, однако при этом ухудшается разрешение пиков. Удерживание определяемых соединений на хроматографической колонке снижается, причем времена удерживания пенициллина G, пенициллина V, оксациллина, клоксациллина, нафциллина и диклоксациллина уменьшаются в значительной степени (рис. 5). Это обусловлено тем, что в воде указанные пенициллины находятся в депротонированном состоянии, а в 0,1% растворе муравьиной кислоты (рН около 2,8) преобладают их молекулярные формы.

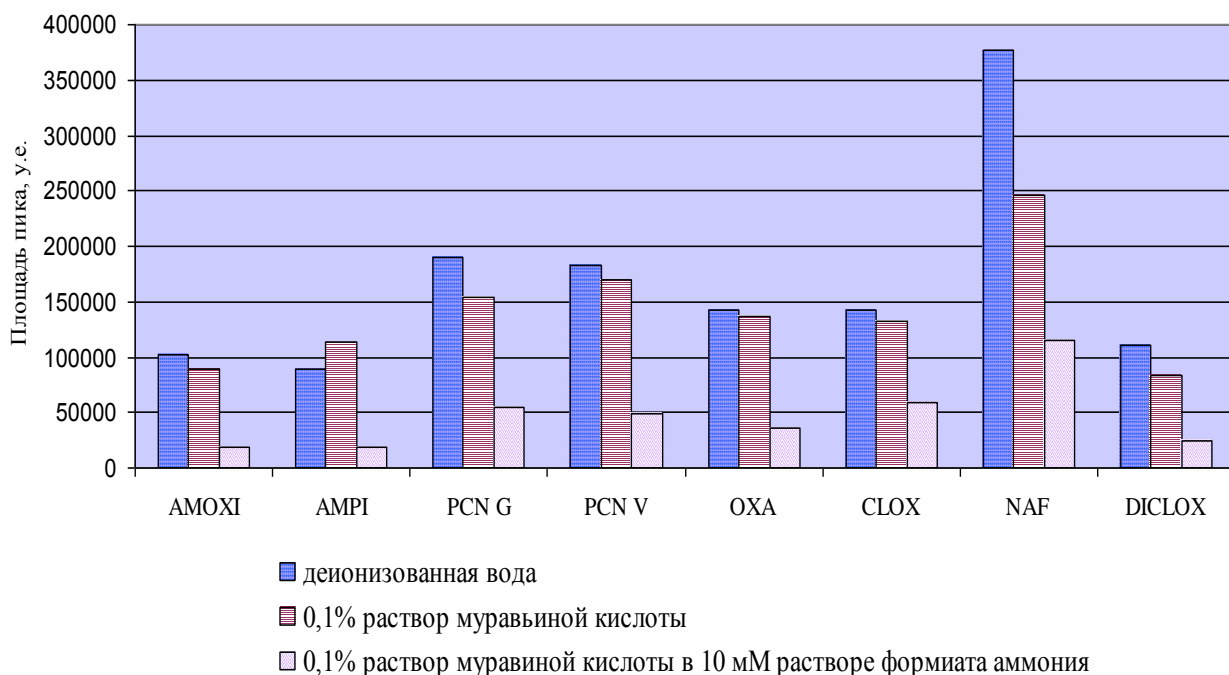


Рис. 4. Зависимость площади пика водного раствора смеси пенициллинов с концентрацией 50 нг/см^3 от состава элюента А.

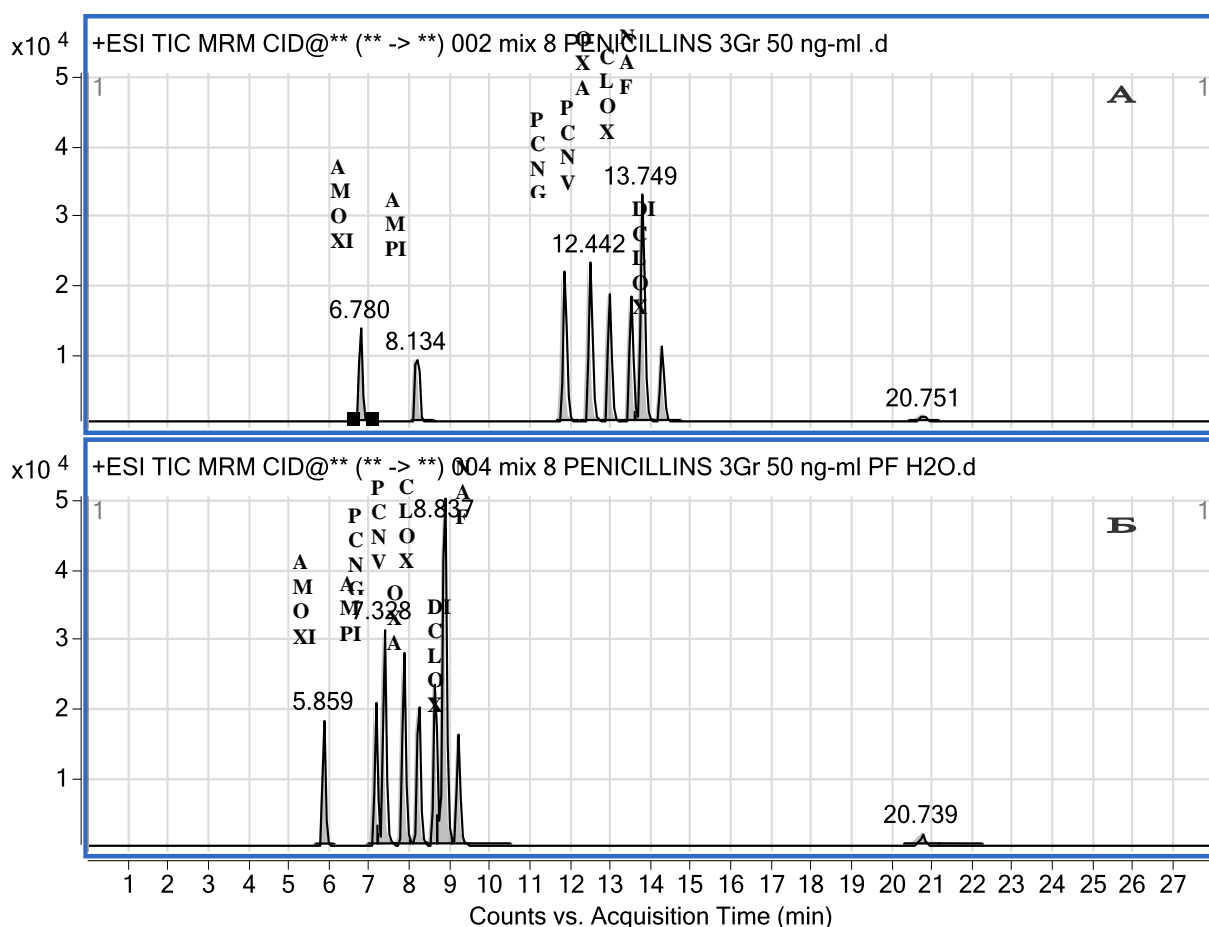


Рис. 5. Хроматограммы, полученные для раствора смеси пенициллинов с концентрацией 50 нг/см^3 , полученные при использовании в качестве элюента А 0,1% раствора муравьиной кислоты (А) и деионизованной воды (Б).

При использовании в качестве элюента 0,1% раствора муравьиной кислоты, содержащей 10 мМ раствор формиата аммония, время удерживания определяемых соединений практически не меняется, однако интенсивность откликов существенно снижается. Очевидно, природа катионов и анионов, присутствующих в подвижной фазе А, влияет на ионизацию аналитов и приводит к образованию аддуктов с соотношением массы к заряду, отличным от регистрируемых масс-спектрометром. Поэтому в качестве элюента А предпочтительнее использовать 0,1% раствор муравьиной кислоты.

Изучили удерживание аналитов на различных обращеннофазных хроматографических колонках: Zorbax SB C₁₈ (2,1 x 150 мм, зернение 3,5 мкм), Zorbax SB C₈ (2,1 x 150 мм, зернение 3,5 мкм), Zorbax Eclips Plus C₁₈ (3,0 x 100, зернение 1,8 мкм), Zorbax Eclips Plus C₈ (3,0 x 100, зернение 1,8 мкм). Результаты исследований представлены в таблице 3.

Разделение компонентов на указанных колонках осуществляется за счет взаимодействия гидрофобных участков молекулы аналита с неполярной алкильной фазой колонок. Показано, что длина углеводородного радикала не оказывает значительного влияния на время удерживания пенициллинов. Установлено, что в заданном режиме элюирования использование всех изученных колонок приводит к удовлетворительному и сопоставимому удерживанию пенициллинов.

Таблица 3. Удерживание пенициллинов на различных хроматографических колонках

Хроматографическая колонка	Время удерживания пенициллинов, мин	Описание
Zorbax SB C ₁₈ (2,1 x 150 мм, 3,5 мкм)	6,5 – 14,0	пики всех пенициллинов четкие, хорошо отделены друг от друга
Zorbax SB C ₈ (2,1 x 150 мм, 3,5 мкм)	6,8 – 14,0	пики всех пенициллинов четкие, хорошо отделены друг от друга
Zorbax Eclips Plus C ₁₈ (3,0 x 100, 1,8 мкм)	7,0 – 14,7	пики всех пенициллинов четкие, хорошо отделены друг от друга
Zorbax Eclips Plus C ₈ (3,0 x 100, 1,8 мкм)	7,0 – 14,7	пики всех пенициллинов четкие, хорошо отделены друг от друга

Несмотря на различие длин и диаметров колонок, было отмечено лучшее удерживание аналитов на неподвижной фазе колонок Zorbax Eclips Plus с зернением 1,8 мкм относительно фазы колонок Zorbax SB с зернением 3,5 мкм. Это, должно быть, в первую очередь обусловлено меньшим диаметром частиц сорбента колонок Zorbax Eclips Plus, что дает большую площадь поверхности сорбента и улучшает удерживание и разделение компонентов. Однако меньший размер частиц колонок типа Zorbax Eclips Plus соответствует большей плотности упаковки сорбента, что привело к росту давления в системе при заданных условиях и в перспективе сократит срок эксплуатации колонки. Оптимального давления в системе можно достичь лишь уменьшением скорости подачи элюента, при этом увеличиваются времена удерживания пенициллинов

и ширина оснований пиков, уменьшается высота пиков и, соответственно, уменьшается чувствительность метода. Длительность анализа возрастает.

Таким образом, для рутинного определения содержания остаточных количеств пенициллинов в сырье животного происхождения и пищевых продуктах предпочтение было отдано колонке Zorbax SB C₈ (2,1 x 150 мм, зернение 3,5 мкм), которая является универсальной, устойчивой в рабочем диапазоне рН и пригодной для проведения серийных анализов.

Очистка от липидов. Для выбора способа очистки экстрактов от липидов изучили распределение аналитов в системе водный раствор смеси пенициллинов : гексан и в системе ацетонитрильный раствор пенициллинов : гексан при концентрации каждого пенициллина 50 нг/см³.

Для проведения экстракции в градуированные пробирки вместимостью 15,0 см³ помещали по 5 см³ водного раствора смеси пенициллинов и по 5 см³ гексана. Содержимое пробирок интенсивно взбалтывали в течение 3 – 4 минут и оставляли в покое на 10 минут для разделения фаз. Верхний органический слой отбрасывали, нижнюю водную фракцию анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. Сравнивали содержание пенициллинов в водном растворе после проведения экстракции гексаном и до ее проведения. Потери пенициллинов после проведения экстракции составили 3,8 – 11,2%, т.е. из водного раствора пенициллины практически не экстрагируются гексаном.

Далее изучили распределение пенициллинов в системе: ацетонитрильный раствор антибиотиков : гексан. Для проведения экстракции в градуированные пробирки вместимостью 15,0 см³ помещали по 5 см³ ацетонитрильного раствора смеси пенициллинов и по 5 см³ гексана. Содержимое пробирок интенсивно взбалтывали в течение 3 – 4 минут и оставляли в покое на 10 минут для разделения фаз. После расслаивания системы верхний гексановый слой отбрасывали. Объем оставшейся ацетонитрильной фракции после проведения экстракции с гексаном составил 4 см³ вследствие частичной взаимной растворимости фаз. Пробирки с нижним ацетонитрильным слоем помещали на нагревательный модуль и упаривали растворитель при температуре 40°C. Одновременно на нагревательный модуль помещали пробирки с 5 см³ ацетонитрильного раствора смеси пенициллинов, не подвергшегося экстракции гексаном. Далее сухой остаток растворяли в 5 см³ деионизованной воды и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. В результате сравнения полученных данных установили, что потери пенициллинов после проведения экстракции гексаном из ацетонитрила составляют 24,7 – 34,0%.

Таким образом, экстракцию липидов следует проводить гексаном из водного раствора пробы для уменьшения потерь определяемых соединений при пробоподготовке.

Подбор условий очистки и концентрирования методом ТФЭ. Поскольку в молекулах пенициллинов присутствуют как полярные, так и неполярные группы, в том числе бензольное кольцо, то удерживание определяемых пенициллинов изучали на картриджах с гидрофобно-гидрофильными полимерными сорбентами, также содержащими в своей структуре бензольное кольцо (Cromabond HR-X 60 мг, Oasis HLB 60 мг, Oasis

HLB 150 мг, Agilent OPT 60 мг). Также было изучено удерживание аналитов на октадецильных картриджах на основе силикагеля – Cromabond C₁₈ 500 мг.

Картриджи последовательно кондиционировали 6 см³ метанола и 6 см³ деионизованной воды. Затем через них пропускали 5 см³ водного раствора смеси 8 пенициллинов с концентрацией 50 нг/см³, промывали 6 см³ деионизованной воды и сушили под вакуумом в течение 10 минут. Затем пенициллины элюировали 6 см³ ацетонитрила. Элюат упаривали на нагревательном модуле при 40°C в токе воздуха. Сухой остаток растворяли в 5 см³ деионизованной воды и анализировали при помощи ВЭЖХ-МС/МС. Результаты исследований представлены на рисунке 6.

Установлено, что при заданных условиях на картриджах Agilent OPT не удерживаются наиболее полярные амоксициллин и ампициллин, крайне слабо удерживается пенициллин G (степень извлечения 11,0%). На картриджах с октадецильной фазой Cromabond C₁₈ также было показано недостаточное удерживание определяемых соединений: для амоксициллина выход составил лишь 5,7%, для ампициллина – 38,8%. Для картриджей Oasis HLB 60 мг были получены приемлемые результаты для всех аналитов, за исключением амоксициллина (выход 27,1%).

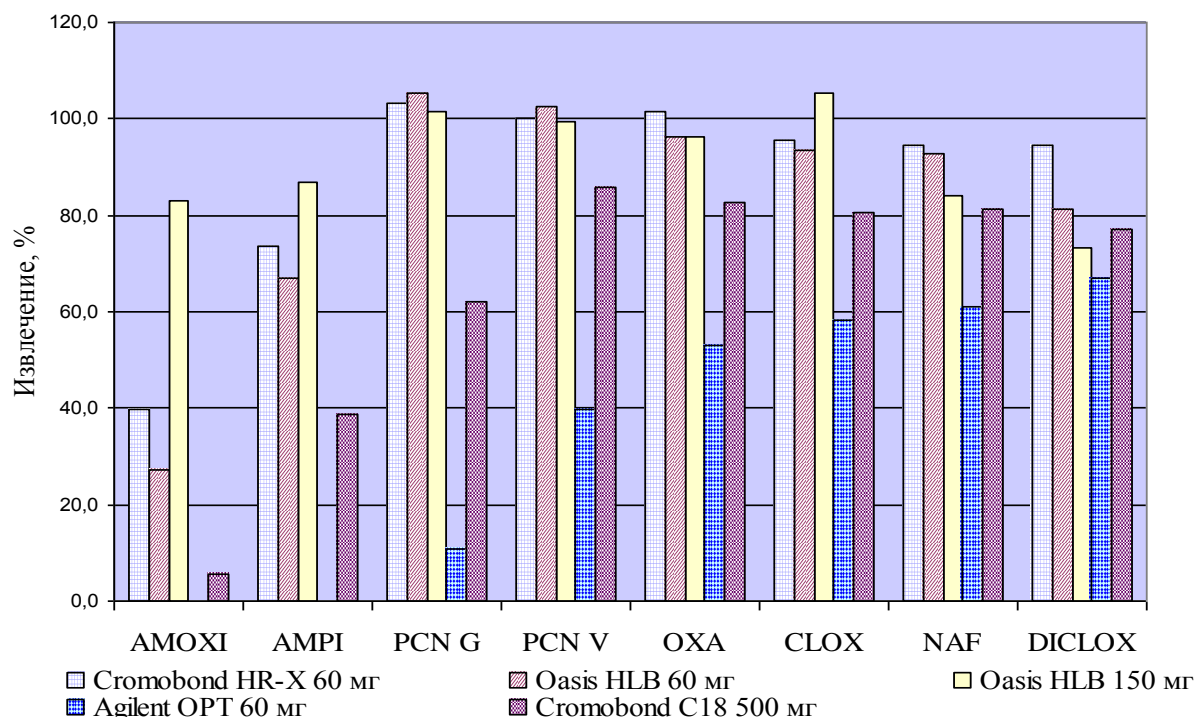


Рис. 6. Зависимость степени извлечения пенициллинов от используемого картриджа для твердофазной экстракции.

В целом наилучшие результаты были получены на картриджах Oasis HLB 150 мг (выход 73,2 – 105,5%) и Cromabond HR-X 60 мг (выход 39,6 – 103,3%). Для дальнейших исследований были выбраны картриджи Oasis HLB 150 мг.

Согласно данным литературы [6-14], для выделения пенициллинов из пищевых матриц и очистки экстрактов на картриджах для твердофазной экстракции в основном используются фосфатные буферные растворы с pH в

диапазоне 6,5 – 9,2. В связи с этим представляло интерес изучить влияние pH буферного раствора на удерживание данных антибиотиков на картриджах Oasis HLB 150 мг. Для этой цели были приготовлены фосфатные буферные растворы с pH 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0; 9,0. Далее на основе указанных буферных растворов были приготовлены растворы смеси 8 пенициллинов с концентрацией 50 нг/см³ каждого. Затем проводили экстракцию на картриджах Oasis HLB 150 мг вышеописанным способом.

Установлено, что лучшее извлечение ампициллина и амоксициллина после твердофазной экстракции достигается при использовании буферного раствора с pH 5,0 – 7,0. Видимо, это связано с амфотерностью данных антибиотиков: в кислой среде они существуют в виде катиона, в нейтральной среде в виде цвиттер-иона и в щелочной среде в виде аниона. В данном диапазоне pH указанные антибиотики находятся в форме цвиттер-ионов, которые являются нейтрально заряженными, менее полярными по сравнению с катионной и анионной формой, и поэтому лучше удерживаются на картриджах Oasis HLB.

Для остальных пенициллинов в исследуемом диапазоне pH не наблюдалось значительных различий в степени извлечения, поскольку они относятся к соединениям кислотного типа, при pH 5 и выше находятся в диссоциированном состоянии. В дальнейшем было решено для очистки методом ТФЭ использовать фосфатный буферный раствор с pH 6,5, так как при pH 6,5 была отмечена относительно более высокая степень извлечения (на 2% – 10%) всех изучаемых антибиотиков за исключением ампициллина.

Количественное определение. Количественное определение содержания пенициллинов проводили по откликам наиболее интенсивных дочерних ионов методом внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерированный пенициллин G-d7.

Градуировочные растворы получали путем внесения аликвот рабочих стандартных растворов смеси пенициллинов в навески «чистых» образцов соответствующих пищевых матриц с последующим проведением через все стадии пробоподготовки и хроматографированием в ранее указанных условиях. Для молока и молочных продуктов готовили серию градуировочных растворов с концентрациями каждого пенициллина 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; 80,0 и 100,0 нг/см³ и строили две калибровочные кривые в диапазонах (2,0 – 20,0) мкг/кг и (10,0 – 100,0) мкг/кг каждого аналита. Для мяса и мясных продуктов готовили серию градуировочных растворов с концентрациями каждого пенициллина 10,0; 20,0; 80,0; 100,0; 400,0; и 800,0 нг/см³ и строили две калибровочные кривые в диапазонах (10,0 – 100,0) мкг/кг и (80,0 – 800,0) мкг/кг каждого аналита.

Калибровочные графики зависимости относительной площади пика (площадь пика анализируемого вещества, деленная на площадь пика внутреннего стандарта) от относительной концентрации (концентрация анализируемого вещества, деленная на концентрацию внутреннего стандарта) строили при помощи программного обеспечения Agilent MassHunter. Все построенные калибровочные графики носили линейный характер. В таблице 4

приведены полученные уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции R^2 для сыра плавленого и свинины.

Валидация. Для валидации разработанной методики использовали различные пищевые продукты (молоко сырое, детскую адаптированную молочную смесь, сыр плавленый, мясо (свинину), печень говяжью) с внесенным содержанием пенициллинов в широком диапазоне концентраций (от 3,0 до 600 мкг/кг каждого антибиотика). Для каждого продукта были установлены значения относительных стандартного отклонения повторяемости (s_r), стандартного отклонения промежуточной прецизионности ($s_{I(TO)}$), расширенной неопределенности (U) и других метрологических характеристик по наибольшим рассчитанным значениям (уровень доверительной вероятности $P = 0,95$). Основные результаты расчета метрологических характеристик для сыра плавленого и свинины приведены в таблице 4. Значения относительной расширенной неопределенности для всех определяемых соединений в различных матрицах находятся в диапазоне от 22,4% до 37,8%.

Таблица 4. Уравнения калибровочных кривых и установленные значения относительных стандартного отклонения повторяемости, стандартного отклонения промежуточной прецизионности и расширенной неопределенности для сыра и мяса

Сыр плавленый					
Наименование антибиотика	Диапазон концентраций		$s_r, \%$	$s_{I(TO)}, \%$	$U, \%$
	2 – 20 мкг/кг	10 – 100 мкг/кг			
Амоксициллин	$y = 0,2609x + 0,0106$ ($R^2 = 0,9978$)	$y = 0,3843x - 0,0276$ ($R^2 = 0,9985$)	8,9	9,0	37,8
Ампициллин	$y = 0,4527x + 0,0218$ ($R^2 = 0,9983$)	$y = 0,7126x - 0,0542$ ($R^2 = 0,9987$)	6,0	6,9	31,2
Пенициллин G	$y = 0,5962x + 0,0257$ ($R^2 = 0,9981$)	$y = 0,708x - 0,0101$ ($R^2 = 0,9994$)	6,5	7,0	32,4
Пенициллин V	$y = 1,4831x + 0,0145$ ($R^2 = 0,9981$)	$y = 1,7115x - 0,0592$ ($R^2 = 0,9993$)	6,6	8,7	32,6
Оксациллин	$y = 1,2417x + 0,0024$ ($R^2 = 0,9977$)	$y = 1,7115x - 0,0592$ ($R^2 = 0,9992$)	5,1	7,2	29,6
Клоксациллин	$y = 0,9582x + 0,0491$ ($R^2 = 0,9989$)	$y = 1,2821x - 0,0497$ ($R^2 = 0,9991$)	7,7	9,8	31,8
Нафциллин	$y = 5,235x + 0,1541$ ($R^2 = 0,9985$)	$y = 7,0943x - 0,4232$ ($R^2 = 0,9990$)	7,1	9,0	31,6
Диклоксациллин	$y = 1,0976x - 0,0005$ ($R^2 = 0,9971$)	$y = 1,3359x - 0,0833$ ($R^2 = 0,9988$)	5,5	9,6	32,6
Мясо (свинина)					
Наименование антибиотика	Диапазон концентраций		$s_r, \%$	$s_{I(TO)}, \%$	$U, \%$
	10 – 100 мкг/кг	80 – 800 мкг/кг			
Амоксициллин	$y = 0,4651x + 0,0068$ ($R^2 = 0,9740$)	$y = 0,5813x - 0,1441$ ($R^2 = 0,9979$)	5,2	6,8	33,4
Ампициллин	$y = 0,7725x - 0,0169$ ($R^2 = 0,9986$)	$y = 0,8538x - 0,1005$ ($R^2 = 0,9983$)	5,3	7	30,4
Пенициллин G	$y = 0,8016x - 0,0086$ ($R^2 = 0,9989$)	$y = 0,9473x - 0,1561$ ($R^2 = 0,9995$)	4,2	4,9	26,0

Пенициллин V	$y = 1,4852x - 0,00243$ ($R^2 = 0,9993$)	$y = 1,715x - 0,2883$ ($R^2 = 0,9995$)	4,3	4,4	25,8
Оксациллин	$y = 1,4958x - 0,026$ ($R^2 = 0,9987$)	$y = 1,7098x - 0,2396$ ($R^2 = 0,9990$)	4,7	6,8	29,4
Клоксациллин	$y = 0,5096x - 0,0059$ ($R^2 = 0,9986$)	$y = 0,6255x - 0,135$ ($R^2 = 0,9989$)	4,6	6,8	28,2
Нафциллин	$y = 4,2948x - 0,0375$ ($R^2 = 0,9987$)	$y = 4,8754x - 0,4707$ ($R^2 = 0,9991$)	5,3	7,6	27,0
Диклоксациллин	$y = 0,5435x - 0,0019$ ($R^2 = 0,9988$)	$y = 0,7179x - 0,1522$ ($R^2 = 0,9994$)	3,2	6,4	25,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана и валидирована унифицированная методика одновременного определения восьми антибиотиков группы пенициллинов в различных пищевых матрицах. Показано, что экстракцию пенициллинов следует проводить ацетонитрильно-водной смесью (2 : 10), так как присутствие ацетонитрила в экстрагирующей смеси способствует осаждению молочных белков. Установлено, что очистку от липидов необходимо проводить гексаном из водного раствора с pH 6,5, получаемого перерастворением в фосфатном буфере упаренного водно-ацетонитрильного экстракта. Изучено удерживание пенициллинов на картриджах для твердофазной экстракции. Разработана процедура доочистки и концентрирования методом ТФЭ. Оптимизация параметров масс-спектрометрического детектирования и хроматографирования позволила добиться максимального отклика определяемых антибиотиков пенициллиновой группы.

Список литературы:

1. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках. М.: Высш. школа, 1998.
2. *Сергеев Т.А.* // Врач и аптека XXI века. 2001. Вып. 9. С. 25.
3. СанПиН. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов: утв. Постановлением МЗ РБ № 52 от 21 июня 2013 г.
4. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 034/2013): принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 67.
5. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 033/2013): принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013 г. № 68.
6. *Becker M., Zittlau E., Petz M.* // Analytica Chimica Acta. 2004. V. 520. P. 19.
7. *Rediker S., Stadler R.H.* // Anal. Chem. 2001. V. 73. P. 1614.
8. <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-3364EN.pdf> (дата обращения 20.04.2017).
9. *Chico J., Rubies A., Centrich F., Companyo R., Prat M.D., Granados M.* // J. Chromatography A. 2008. V. 1213. P. 189.
10. *Riediker S., Diserens J.-M., Stadler R.H.* // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 4171.
11. *Huber U.* Analysis of antibacterial drugs by HPLC / U. Huber [Electronic resource]. Mode of access: www.agilent.com/chem. No 5968 - 1078E (дата обращения 20.04.2017).
12. *Song J.Y., Hu S. J., Joo H., Hwang J. B., Kim M. O., Kang Sh. J., Cho D. H.* // World Academy of Science, Engineering and Technology. 2011. V. 57. P. 809.

13. Ikaia Y., Okaa H., Matsumotoa H., Miyazakia Y., Takebab K., Nagasec H. // J. Chromatography A. 2001. V. 911. P. 217.
14. Wang J. // J. AOAC International. 2004. V. 87. P. 45.

PROCEDURE FOR MONITORING RESIDUAL CONTENT OF PENICILLIN GROUP ANTIBIOTICS IN FOODSTUFFS OF ANIMAL ORIGIN

E. I. Polianskikh, A. G. Polonevich, and L. L. Belysheva*

Republican Unitary Enterprise “Scientific Practical Centre of Hygiene”, Minsk, Republic of Belarus, *e-mail: gannapalanevich@gmail.com

Received April 20, 2017

Abstract – A procedure for simultaneous determination of residual content of eight penicillin group antibiotics in foodstuffs of animal origin using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method was developed. The procedure involves liquid solvent extraction of target analytes from food matrix with the use of water-acetonitrile mixture, purification from lipids with hexane followed by solid phase extraction. The analytes were separated on reversed-phase column using gradient elution mode. Quantification of analytes was performed by the internal standard method with matrix-matched curves. The range of determined concentrations for each penicillin type varied from 2 to 100 mkg/kg for milk and dairy products, and from 10 to 800 mkg/kg for meat and meat products.

Keywords: penicillins, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, extraction, solid phase extraction, foodstuffs of animal origin.