



APPLICATION NOTE

Жидкостная хроматография
/ Масс-спектрометрия

Авторы:
Avinash Dalmia
PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT

Определение различных классов антибиотиков в молоке методом ВЭЖХ-МС/МС

Введение

Антибиотики широко используются в ветеринарии для профилактики и лечения болезней у животных. Чрезмерное использование ветеринарных препаратов может привести к переносу антибиотиков в продукты питания, например, в молоко, яйца, мясо, что представляет опасность для здоровья людей.

Остаточное содержание антибиотиков в пище может делать ее токсичной и вызывать побочные эффекты, такие как аллергические реакции, сыпь, тошнота и т.д. Кроме того, потребление пищевых продуктов с низкой концентрацией антибиотиков в течение длительного времени, приводит к развитию лекарственно-устойчивых бактерий. В связи с этим нормативные требования по использованию антибиотиков в животноводстве приняты практически во всем мире. Например, в странах ЕС и Канаде установлены предельно допустимые концентрации (ПДК) (MRLs - maximum residue levels) лекарственных препаратов в пищевых продуктах, а в США это так называемые уровни толерантности.

Лекарственные препараты, содержание которых нормируется в молоке, подразделяются на несколько классов: сульфониламиды, β -лактамы, фторхинолоны, макролиды и тетрациклины. В таблице 1 приведены значения ПДК для различных классов антибиотиков, определяемых в данной работе согласно нормативному документу, действующему на территории США [1].

Цель данного исследования – разработка быстрого и чувствительного метода ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения антибиотиков разных классов в молоке.

Определяемые антибиотики: ципрофлоксацин, сарафлоксацин, офлоксацин, пенициллин-G, клоксациллин, тилмикозин, тилозин, эритромицин, сульфаметазин, сульфаметоксазол, сульфадиметоксин, тетрациклин и хлортетрациклин.

В качестве внутренних стандартов использовали ципрофлоксацин-d8 и флуниксин-d3.

Пробоподготовку проводили с помощью модифицированного метода QuEChERS (QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe - Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно).

Таблица 1. Предельно допустимые концентрации антибиотиков в молоке на территории США

Антибиотик	Класс антибиотиков	ПДК ^а
Сульфаметазин	Сульфониламиды	10 нг/мл ^б
Сульфаметоксазол	Сульфониламиды	10 нг/мл ^б
Сульфадиметоксин ^е	Сульфониламиды	10 нг/мл ^б
Тилмикозин	Макролиды	100 нг/мл ^в
Тилозин	Макролиды	50 нг/мл
Эритромицин	Макролиды	50 нг/мл
Пенициллин-G	β -лактамы	5 нг/мл
Клоксациллин	β - лактамы	10 нг/мл
Офлоксацин	Фторхинолоны	5 нг/мл ^г
Ципрофлоксацин	Фторхинолоны	5 нг/мл ^г
Сарафлоксацин	Фторхинолоны	5 нг/мл ^г
Тетрациклин	Тетрациклины	300 нг/мл ^д
Хлортетрациклин	Тетрациклины	300 нг/мл ^д

а – Толерантность или безопасный уровень в молоке согласно [1].

б – Указанные значения являются «безопасным уровнем»

в – ПДК для молока отсутствует. Значение ПДК взято из НД на мясную продукцию.

г – ПДК отсутствует. Принятое значение 5 нг/мл.

д – ПДК для суммы антибиотиков данного класса.

е – Использование сульфониламидных препаратов в период лактации молочного скота (кроме сульфадиметоксина) запрещено [1].

Экспериментальная часть

Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ PerkinElmer с масс-спектрометрическим детектором QSigh 210 (масс-анализатор - тройной квадруполь) (PerkinElmer). Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3Q™ (PerkinElmer).

Стандартные растворы и пробоподготовка.

Чистота всех используемых растворителей и реактивов была класса «для ВЭЖХ-МС». Все стандартные образцы антибиотиков были приобретены у Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO и хранились при 4°C для предотвращения их разложения. Сорбент C18 (end capped) для дисперсионной твердофазной экстракции (ДФЭ) был приобретен у Supelco.

Все стандартные растворы антибиотиков за исключением β-лактамов готовили в метаноле. Для приготовления стандартных растворов β-лактамов использовали воду. Стандартные растворы β-лактамов необходимо хранить в пластиковой посуде, растворы остальных антибиотиков можно хранить как в стеклянной, так и в пластиковой посуде. Для предотвращения разложения все стандартные растворы хранили при 2°C в посуде темного стекла. Количественного определения антибиотиков проводили методом внутреннего стандарта. Внутренний стандарт цiproфлоксацина-d8 использовали для количественного определения фторхинолонов, сульфониламидов и тетрациклинов; внутренний стандарт флуниксин-d3 для макролидов и β-лактамов.

В качестве матрицы для приготовления калибровочных растворов использовали цельное молоко из категории «органический продукт», приобретенное в местном магазине. Пять испытуемых образцов молока различной степени жирности также были приобретены в местном магазине.

Для пробоподготовки использовали модифицированный метод QuEChERS [2, 3].

Приготовление испытуемых растворов образцов молока:

1. К 5 мл испытуемого образца молока, содержащего внутренние стандарты с концентрацией 15 нг/мл добавляли 20 мл органического растворителя (метанол или ацетонитрил).
2. Полученную смесь интенсивно встряхивали в течение минуты, а затем центрифугировали при 7800 об/мин в течение 10 мин.
3. Отбирали надосадочную жидкость и добавляли к ней 1.2 грамма сорбента C18 (ДФЭ) для удаления жира.
4. Полученную смесь интенсивно встряхивали в течение 5 минут, а затем центрифугировали при 7800 об/мин в течение 5 мин.
5. Отбирали 12.5 мл надосадочной жидкости, упаривали растворитель в токе азота при температуре 40°C до 1.5 - 2 мл.
6. К остатку добавляли 15% раствор метанола в воде, доводя суммарный объем приблизительно до 2.5 мл.
7. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм.

Приготовление калибровочных растворов с использованием матрицы:

Матрицу для калибровочных растворов готовили из молока категории «органический продукт» аналогично вышеописанной схеме, кроме первой стадии, которую осуществляли без добавления внутреннего стандарта. Калибровочные растворы готовили добавлением соответствующих аликвот стандартных растворов антибиотиков и раствора внутренних стандартов к матрице, получая девять калибровочных растворов с концентрациями в диапазоне 0.1-1000 нг/мл. Каждый калибровочный раствор анализировали 5 раз.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

Хроматографические условия и параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора представлены в таблице 2. Времена удерживания и параметры MRM переходов определяемых антибиотиков представлены в таблице 3. Для повышения достоверности идентификации определяемых соединений использовали три MRM перехода для каждого антибиотика [4].

Таблица 2. Хроматографические условия и параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора.

Хроматографические условия					
Хроматографическая колонка	PerkinElmer Brownle SPP C18, 100 x 2.1 мм, 2.7 мкм (Part # N9308404)				
Подвижная фаза	А: 5 мМ формиат аммония и 0.1% муравьиная кислота В: 0.1% муравьиная кислота в смеси 95/5 ацетонитрил/метанол				
	Программа градиентного элюирования				
	Шаг	Время (мин)	%А	%В	Кривая градиента
	1	0	95.0	5.0	
	2	0.50	95.0	5.0	6
	3	7.50	40.0	60.0	6
	4	10.00	0.0	100.0	6
	5	15.00	0.0	100.0	6
	6	15.30	95	5.0	6
Время анализа	15 мин; время равновесия 4.2 мин				
Поток	0.4 мл/мин	Давление:	4200 psi/285 bar (максимум)		
Температура термостата	30 °С				
Вводимый объем	10 мкл				
Температура образцов (автодозатор)	7 °С				

Параметры источника ионизации	
Режим ионизации	ESI +
Осушающий газ (азот)	75 единиц
Температура HSID интерфейса	320 °C
Напряжение ESI +	5500 В
Температура источника	425 °C
Распыляющий газ (азот)	175 единиц
Режим работы масс-анализатора	MRM

Таблица 3. Времена удерживания t_R и параметры MRM переходов определяемых соединений.

Компонент	t_R (мин)	Р ион ¹	К ион ²	CE [*]	П1 ион ³	CE [*]	П2 ион ⁴	CE [*]
Сульфаметазин	3.37	279.1	186	20	156	25	107.9	40
Сульфаметоксазол	4.38	254.1	107.9	40	91.7	55	156	30
Сульфадиметоксин	5.15	311.1	156	25	91.7	40	107.9	50
Тилмикозин	4.93	435.3	695.4	20	174	30	87.9	55
Тилозин	5.70	916.5	174	46	100.9	64	144.9	48
Эритромицин	5.41	734.4	158	40	576.2	22	115.9	66
Пенициллин-Г	5.38	334.9	160	22	176	22	113.9	48
Клоксациллин	6.6	436.2	277.1	18	113.9	62	178	50
Офлоксацин	3.30	361.9	317.9	25	343.9	25	260.9	35
Ципрофлоксацин	3.38	331.9	313.9	24	230.9	51	187.9	75
Сарафлоксацин	3.93	385.9	367.9	28	341.9	24	298.9	36
Тетрациклин	3.52	445.1	410.1	16	154	24	97.9	36
Хлортетрациклин	4.33	479	444	26	462	22	154	36
Ципрофлоксацин- d_8	3.36	340.1	235	48	-	-	-	-
Флуниксин- d_3	7.20	300	282	30	-	-	-	-

1- (Р ион) Родительский ион.

2- (К ион) Количественный ион.

3- (П1 ион) Подтверждающий ион 1.

4- (П2 ион) Подтверждающий ион 2.

* - CE (В) - (Collision energy) – энергия соударений.

Обсуждение результатов

Предел количественного определения, диапазон концентраций калибровочного графика и квадрат коэффициента линейной корреляции (R^2) определяемых соединений представлены в таблице 4.

Таблица 4. ПКО, диапазон концентраций и квадрат коэффициента линейной корреляции (R^2) определяемых соединений.

Компонент	ПКО в молоке (нг/мл)	Диапазон концентраций (нг/мл)	R^2
Сульфаметазин	0.1	0.1-1000	0.9986
Сульфаметоксазол	0.1	0.1-1000	0.9996
Сульфадиметоксин	0.1	0.1-1000	0.9991
Тилмикозин	0.1	0.1-1000	0.9990
Тилозин	1	1-1000	0.9980
Эритромицин	0.3	0.3-1000	0.9958
Пенициллин-G	1	1-1000	0.9981
Клоксациллин	1	1-1000	0.9985
Офлоксацин	0.1	0.1-1000	0.9982
Ципрофлоксацин	0.1	0.1-1000	0.9978
Сарафлоксацин	0.1	0.1-1000	0.9968
Тетрациклин	0.3	0.3-1000	0.9956
Хлортетрациклин	0.3	0.3-1000	0.9984

Полученные значения ПКО ниже значений ПДК в 5-100 раз, что свидетельствует о более, чем достаточной чувствительности метода для анализа определяемых соединений в молоке.

На рисунке 1 показаны хроматограммы трех MRM переходов сульфаметазина, полученные при анализе молока с концентрацией антибиотика 5 нг/мл. Все хроматограммы демонстрируют хорошее соотношение сигнал/шум.

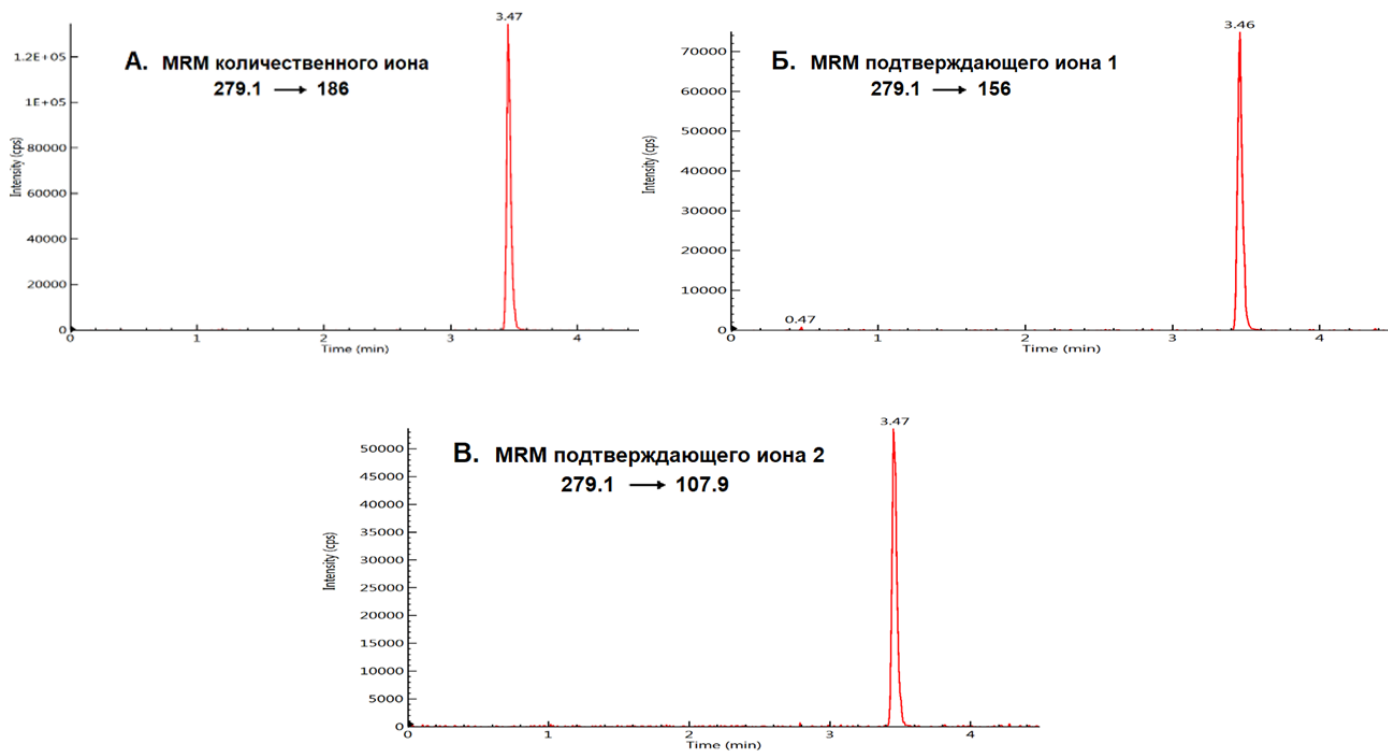


Рисунок 1 MRM переходы сульфаметозина (концентрация в молоке 5 нг/мл).

Рисунок 2 представлен калибровочный график сульфаметозина в диапазоне концентраций 0.1 – 1000 нг/мл.

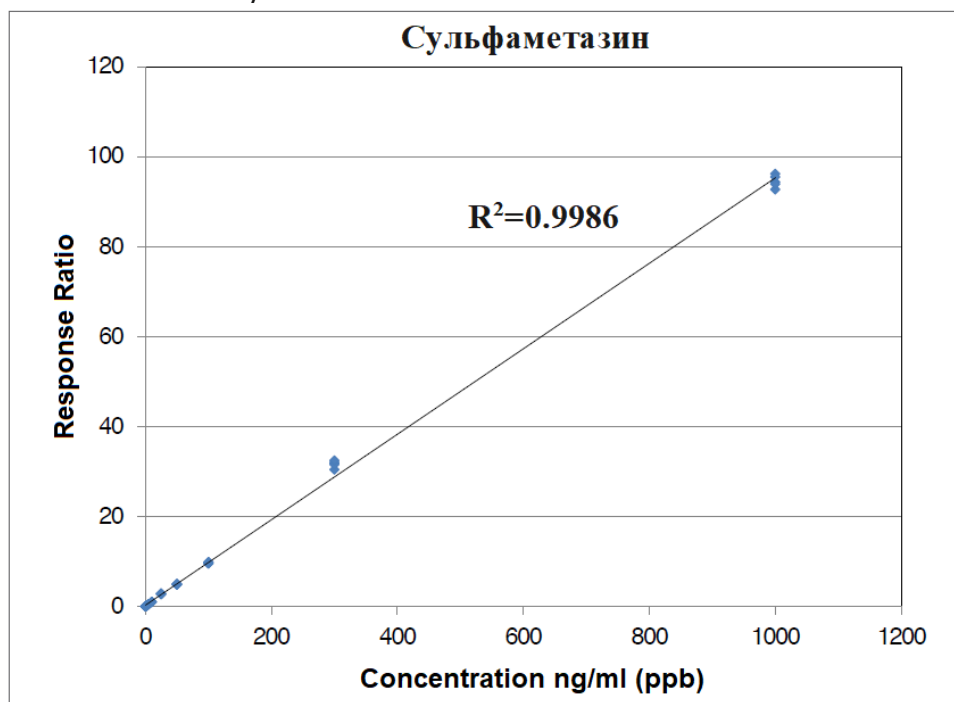


Рисунок 2. Калибровочная кривая сульфаметозина.

Калибровочные кривые имели хорошую линейность – квадрат коэффициента линейной корреляции для всех аналитов был более 0.9958 ($R^2 > 0.9958$).

Согласно данным, представленным в таблице 5, наблюдается хорошая повторяемость результатов на примере пяти параллельных измерений (n=5), проведенных для каждого из испытуемых образцов молока, содержащих различные концентрации антибиотиков. Для концентраций в два раза меньше чем значения ПДК относительные среднеквадратические отклонения (СКО, %) не превышали 5%.

Таблица 5. Значения СКО, % при n=5 для различных концентраций антибиотиков в молоке.

Компонент	2.5 нг/мл СКО, %	5 нг/мл СКО, %	10 нг/мл СКО, %	25 нг/мл СКО, %	50 нг/мл СКО, %	100 нг/мл СКО, %
Сульфаметазин	2.4	2.4	1.1	1.4	0.8	0.7
Сульфаметоксазол	3.5	4.7	2.8	1.7	2.9	1.4
Сульфадиметоксин	3.0	0.8	2.0	1.6	1.2	1.7
Тилмикозин	0.7	1.5	1.8	0.7	0.8	1.1
Тилозин	7.8	4.3	3.9	2.1	2.2	1.4
Эритромицин	4.7	3.8	4.0	1.7	2.3	0.8
Пенициллин-Г	3.0	4.4	4.2	1.4	2.6	1.5
Клоксациллин	4.5	4.4	3.7	2.5	1.8	1.4
Офлоксацин	2.9	1.9	2.6	1.5	1.7	1.8
Ципрофлоксацин	2.2	2.3	0.9	3.1	1.0	1.1
Сарафлоксацин	2.4	2.8	2.0	1.5	2.0	0.7
Тетрациклин	6.1	5.9	6.1	4.7	2.8	1.3
Хлортетрациклин	5.6	5.0	5.7	3.6	4.1	2.1

В таблице 6 приведены усредненные данные, полученные при изучении степени извлечения (СИ) определяемых компонентов, при концентрациях близких к их значениям ПДК. Средние значения получены по результатам пяти параллельных определений (n=5). Степень извлечения макролидов, сульфониламидов и β-лактамов находилась в диапазоне 70 - 120%, а значения СКО, %, полученные для пяти параллельных определений, составили менее 20%. Степень извлечения фторхинолонов была в пределах 60 - 70%, а тетрациклинов - менее 30%. Степень извлечения внутренних стандартов ципрофлоксацина-d₈ и флуниксина-d₃ была около 70 и 90% соответственно.

Фторхинолоны и их дейтерированные аналоги имеют практически одинаковые потери в процессе экстракции, поэтому целесообразно компенсировать более низкие степени извлечения антибиотиков данной группы использованием соответствующих внутренних стандартов.

После коррекции степени извлечения с использованием дейтерированного фторхинолона, в качестве внутреннего стандарта, степень извлечения фторхинолонов находилась в интервале 80 - 110%, а для тетрациклинов составляла около 30%. Низкая степень извлечения антибиотиков тетрациклиновой группы свидетельствует о необходимости использования дейтерированного тетрациклина в

качестве внутреннего стандарта для компенсации их потерь в процессе пробоподготовки.

Также в таблице 6 приведены данные о влиянии используемого органического растворителя для осаждения белков (ацетонитрил или метанол) на степень извлечения определяемых соединений и эффект подавления ионизации. Степень извлечения для всех определяемых антибиотиков практически не зависела от используемого растворителя, за исключением эритромицина, для которого она составляла около 27 и 98% при использовании ацетонитрила и метанола соответственно.

Влияние матрицы на процесс ионизации (подавление или усиление) определяли с помощью отношения отклика детектора на определяемый антибиотик в молочной матрице к отклику детектора для его стандартного раствора в чистом растворителе. Для сульфонамидов, макролидов и β -лактамов влияние матрицы на процесс ионизации было незначительным вне зависимости от используемого для пробоподготовки растворителя. В тоже время, для фторхинолонов и тетрациклинов наблюдалось усиление ионизации в присутствии матрицы особенно в случае использования метанола в качестве растворителя для пробоподготовки.

Таблица 6. Степень извлечения компонентов (СИ), СКО, % и матричные эффекты (МИ) при использовании метанола или ацетонитрила для осаждения белков в процессе пробоподготовки (n=5).

Компонент	С* (нг/мл)	Метанол			Ацетонитрил		
		СИ	СКО	МИ	СИ	СКО	МИ
Сульфаметазин	10	102 %	8 %	110 %	101 %	9 %	102 %
Сульфаметоксазол	10	103 %	10 %	93 %	105 %	13 %	97 %
Сульфадиметоксин	10	96 %	7 %	111 %	104 %	7 %	106 %
Тилмикозин	50	89 %	10 %	127 %	82 %	15 %	103 %
Тилозин	50	97 %	14 %	83 %	92 %	17 %	97 %
Эритромицин	50	98 %	11 %	80 %	27 %	17 %	91 %
Пенициллин-G	10	103 %	10 %	94 %	84 %	10 %	96 %
Клоксациллин	10	94 %	13 %	97 %	96 %	13 %	102 %
Офлоксацин	10	101 %	17 %	163 %	97 %	1.7 %	181 %
Ципрофлоксацин	10	102 %	16 %	174 %	87 %	1.0 %	163 %
Сарафлоксацин	10	104 %	11 %	162 %	96 %	9 %	142 %
Тетрациклин	50	32 %	5 %	152 %	24 %	5 %	120 %
Хлортетрациклин	50	25 %	8 %	177 %	21 %	10 %	130 %

* - Концентрации определяемых компонентов (нг/мл).

Пять образцов молока различной жирности (от 1% до 5%) были проверены на содержание антибиотиков с помощью разработанного метода. Ни один из определяемых компонентов не был обнаружен даже на уровне концентраций в три раза ниже чем значение ПКО (0.1–1 нг/мл). Относительное среднеквадратическое отклонение (СКО, %) степени извлечения двух внутренних стандартов из образцов молока с различным содержанием жира составляло менее 15%.

Использование двух подтверждающих ионов для идентификации определяемых антибиотиков улучшает специфичность методики. В таблице 7 приведены средние значения соотношения ионов (соотношения интенсивностей ионов), для каждого компонента, рассчитанные при анализе концентраций в диапазоне от половины ПДК до его 10-кратного значения. Относительное отклонение для соотношения ионов во всем диапазоне концентраций не превышало $\pm 12\%$ от среднего значения, что ниже допустимого предела ($\pm 30\%$), установленного в документе SANCO [5] для анализа кормов и продуктов питания.

Таблица 7. Средние значения соотношения ионов (соотношения интенсивностей ионов) определяемых компонентов.

Компонент	П1 ион ¹	Отн отклон для иона П1 ²	П2 ион ³	Отн отклон для иона П2 ⁴
Сульфаметазин	57 %	$\pm 5 \%$	43 %	$\pm 6 \%$
Сульфаметоксазол	99 %	$\pm 5 \%$	90 %	$\pm 6 \%$
Сульфадиметоксин	38 %	$\pm 6 \%$	29 %	$\pm 5 \%$
Тилмикозин	76 %	$\pm 5 \%$	64 %	$\pm 5 \%$
Тилозин	44 %	$\pm 6 \%$	26 %	$\pm 11 \%$
Эритромицин	46 %	$\pm 5 \%$	24 %	$\pm 6 \%$
Пенициллин-Г	78 %	$\pm 5 \%$	50 %	$\pm 10 \%$
Клоксациллин	43 %	$\pm 5 \%$	38 %	$\pm 6 \%$
Офлоксацин	69 %	$\pm 9 \%$	62 %	$\pm 7 \%$
Ципрофлоксацин	43 %	$\pm 5 \%$	2.5 %	$\pm 12 \%$
Сарафлоксацин	13 %	$\pm 7 \%$	8.1 %	$\pm 7 \%$
Тетрациклин	23 %	$\pm 6 \%$	21 %	$\pm 10 \%$
Хлортетрациклин	68 %	$\pm 6 \%$	37 %	$\pm 6 \%$

1- (П1 ион) среднее значение отношения интенсивностей сигналов подтверждающего иона 1 и количественного иона.

2- (Отн отклон для иона П1) относительное отклонение от среднего значения для подтверждающего иона 1.

3- (П2 ион) среднее значение отношения интенсивностей сигналов подтверждающего иона 1 и количественного иона.

4- (Отн отклон для иона П2) относительное отклонение от среднего значения для подтверждающего иона 1.

Долгосрочная стабильность системы (стабильность отклика масс-спектрометрического детектора на определяемые компоненты) тестировалась с помощью непрерывного в течение 6 дней анализа экстракта молока, с концентрацией сульфонамидов, фторхинолонов, β -лактамов равной 10 нг/мл, макролидов и тетрациклинов 50 нг/мл. На рисунке 3 показаны значения отклика детектора на сульфаметазин с концентрацией в экстракте молока 10 нг/мл относительно внутреннего стандарта от количества проведенных анализов, демонстрирующие высокую стабильность в течение всего эксперимента.

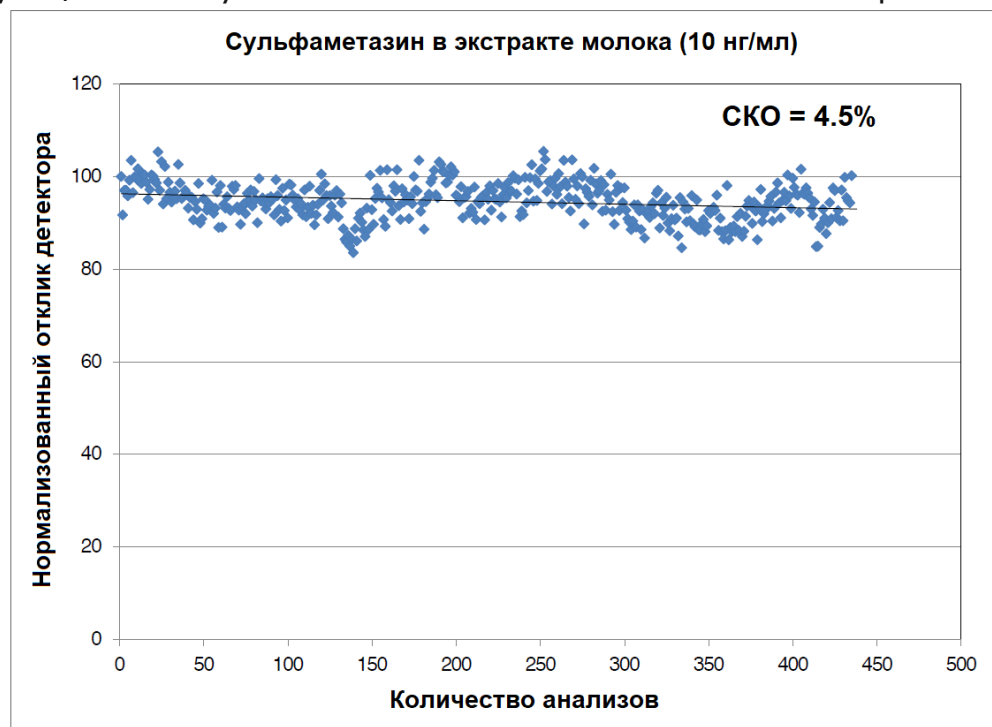


Рисунок 3. Зависимость отклика детектора масс-спектрометрического на сульфаметазин с концентрацией в экстракте молока 10 нг/мл от количества выполненных анализов.

Как видно из рисунка 3 отклик детектора на сульфаметазин не менялся на протяжении шести дней непрерывных анализов (более 400 анализов), что демонстрирует превосходную стабильность масс-спектрометрического детектора QSight (PerkinElmer). Отклик детектора для 10 определяемых антибиотиков из 13 также не снижался в течение 6 дней непрерывных инъекций экстракта молока. Отклик детектора на эритромицин, тилозин и офлоксацин после 6 дней непрерывных инъекций снизился на 30% от исходного значения, что может быть объяснено разложением данных соединений при хранении экстракта.

Заключение

Разработан простой, надежный и чувствительный метод ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения антибиотиков разных классов в молоке с использованием модифицированного метода QuEChERS для пробоподготовки. Долгосрочная стабильность отклика масс-спектрометрического детектора на определяемые компоненты демонстрирует возможность ВЭЖХ-МС/МС PerkinElmer работать с грязными матрицами без потери времени на техническое обслуживание системы.

Список литературы

- [1] U S FDA/CFSAN Tolerance and /or Safe Levels of Animal Drug Residues in Milk; memo dated Sep 27, 2005.
- [2] S. B. Clark, J. M. Storey, S. B. Turnipseed, FDA Laboratory Information Bulletin, Lib # 4443, <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM239311.pdf>
- [3] L. Geis-Asteggiate, S. J. Lehotay, A. R. Lightfield, T. Dutko, C. Ng, L. Bluhm, J. Chrom. A, 2012, 1258, 43.
- [4] T. Yamaguchi, M. Okihashi, K. Harada, K. Uchida, Y. Konishi, K. Kajimura, K. Hirata, Y. Yamamoto, J. Agri. Food Chem., 2015, 63, 5133.
- [5] European Commission Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Residues Analysis in food and feed, SANCO12571(2013), http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf