

УДК 543.544.5.068.7:543.51

ПРОБОПОДГОТОВКА, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДВЕНАДЦАТИ МАКРОЛИДОВ В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

В.Г. Амелин^{1,2*}, Д.С. Большаков²

(¹Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых; ²Федеральный центр охраны здоровья животных; *e-mail: amelinvg@mail.ru)

Предложен простой способ извлечения, идентификации и определения 12 антибиотиков-макролидов (азитромицина, рокситромицина, джозамицина, спирамицина I–III, тилмикозина, тилозина, эритромицина, кларитромицина, тилвалозина и тулатромицина) в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения. Диапазон определяемого содержания макролидов 1–400 нг/г, пределы обнаружения 0,01–0,50 нг/г, пределы определения 0,04–2 нг/г. Предложена схема идентификации и определения обнаруживаемых антибиотиков методом стандартной добавки. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 21%. Продолжительность скрининга проб 40 мин, время определения обнаруженных антибиотиков 1,0–1,5 ч.

Ключевые слова: антибиотики-макролиды, пищевые продукты, высокоэффективная жидкостная хроматография, времяпролетная масс-спектрометрия высокого разрешения.

Макролиды широко используются в медицине и ветеринарии для профилактики и лечения микробных инфекций. Это антибиотики среднего спектра действия активны относительно грамположительных и грамотрицательных бактерий. Считается, что наличие остаточного количества макролидов в пищевых продуктах может представлять потенциальный риск для потребителей из-за возможных аллергических реакций на антибиотики и/или их метаболиты.

Макролиды в пищевых продуктах, кормах и воде определяют методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС, HPLC-MS/MS) при ионизации электроспреем [1–3, 5–10, 11–13] или методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ/ПАЛДИ, MALDI/SALDI) [10, 12] (табл. 1). Если не требуется высокая чувствительность, определение проводят методом ВЭЖХ с испарительным детектированием светового рассеяния (СПД, ELSD) или диодно-матричным детектированием (ДМД, DAD) [4, 14]. Практически во всех методиках пробоподготовка сводится к извлечению макролидов из пробы органическим растворителем и очист-

ке экстракта методом твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием картриждей на основе поли(дивинилбензол-Со-N-винилпирролидона) («Oasis[®] HLB») [1–5, 8, 9, 11, 14]. Однако предлагаемые методики малочувствительны и длительны. Обычно для устранения матричного эффекта проводят матричную градуировку на анализируемом объекте, что дорого и экономически не оправдано.

В данной работе рассматривается сочетание простой пробоподготовки с одновременной идентификацией и чувствительным определением 12 макролидов и их изомерных форм по точным массам ионов в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Экспериментальная часть

Аппаратура. В работе использовали жидкостной хроматограф «UltiMate 3000» («Thermo Scientific», США) в сочетании с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором «maXis 4G» («Bruker Daltonics», Германия). Разделение проводили на колонке (150×2,1 мм)

Т а б л и ц а 1

Определение макролидов в продовольственном сырье, пищевых продуктах, воде и биологических жидкостях

Макролиды	Матрица (объект анализа)	Пробоподготовка	Метод анализа	Колонка	LOD, мг/кг	Литература
Эритромицин, азитромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин, тулатромицин, кларитромицин, рокситромицин, мидекамицин, джозамицин	корма	экстракция боратным буферным раствором и очистка методом ТФЭ	ВЭЖХ-СРД	250×4,6 мм, 5 мкм	400–800	[14]
Эритромицин, азитромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин	молоко, свинина и мясо птицы	экстракция ацетонитрилом	ВЭЖХ-МС/МС	100×2,1 мм, 5 мкм	5–25	[13]
Эритромицин, азитромицин, тилмикозин, рокситромицин	рыба	экстракция метанолом, очистка методом ТФЭ (графен)	ВЭЖХ-МС/МС	50×2,1 мм, 1,7 мкм	0,09–0,23	[11]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин	моча человека	ДЖЖМЭ	ПАЛДИ	–	2–3 нМ	[10]
Эритромицин, тилозин, рокситромицин, китазамицин	вода	ТФЭ	ВЭЖХ-МС/МС	250×4,6 мм, 5 мкм	10 нг/л	[9]
Эритромицин, азитромицин, тилозин, спирамицин, кларитромицин, джозамицин	вода	ТФЭ	ВЭЖХ-МС/МС	150×2,1 мм, 3 мкм	2,2–6,5 нг/л	[8]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин, тулатромицин, тролеандомицин, джозамицин	мясо, рыба	PLE extraction	ВЭЖХ-МС/МС	250×4,6 мм, 5 мкм	18–51	[7]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, джозамицин	молоко	QuEChERS	ВЭЖХ-МС/МС	100×2,1 мм, 1,7 мкм	1	[6]
Тулатромицин	плазма крови	ТФЭ	ВЭЖХ-МС/МС	100 ×2,1 мм, 5 мкм	6 мкг/л	[5]

Окончание табл. 1

Макролиды	Матрица (объект анализа)	Пробоподготовка	Метод анализа	Колонка	LOD, мг/кг	Литература
Эритромицин А, тилозин, тилмикозин, тролеандомицин, спирамицин, рокситромицин, джозамицин	печень, почки	экстракция буферным раствором МакИлвейна, очистка методом ТФЭ	ЖХ-ДМД	250×4,6 мм, 5 мкм	60–1000	[4]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, олеандомицин, спирамицин	яйца	экстракция ацетонитрилом, очистка методом ТФЭ	ВЭЖХ-МС/МС	50×2 мм, 2,2 мкм	<1,0	[3]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин, джозамицин	мед	экстракция фосфатным буферным раствором, очистка методом ТФЭ	ВЭЖХ-МС/МС	50×2 мм, 2,2 мкм	0,4–0,9	[2]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин, джозамицин, олеандомицин, китазамицин	мясо домашней птицы	экстракция смесью вода–метанол/метафосфорная кислота, очистка методом ТФЭ	ВЭЖХ-МС/МС	250×4,6 мм, 5 мкм	1–23 мкг/л	[1]
Эритромицин, тилозин, тилмикозин, спирамицин, джозамицин	пищевые продукты, корма	экстракция ацетонитрилом	МАЛДИ/ПАЛДИ	–	0,01–0,3	[12]

Acclaim™ 120 C18 (2,2 мкм) («Thermo Scientific», США) в режиме градиентного элюирования подвижной фазы.

Реактивы. В качестве реактивов использовали азитромицин (95,0%), джозамицин (98,0%), кларитромицин (98,0%), эритромицин А-дигидрат (95,4%), спирамицин (95,9%), («Sigma-Aldrich», США); тилвазолин (98,0%) («LGM Pharma», США); тулатромицин А (98,0%) («AbMole BioSciences», США); тилозин тартрат (95,5%), тилмикозин (смесь изомеров) (85,2%) («Fluka», США); рокситромицин (96,5%) («Dr. Ehrenstorfer GmbH», Германия). В работе использовали также метанол, ацетонитрил, муравьиную кислоту, *n*-гексан, изопропанол («Merck», Германия).

Условия хроматографического разделения и детектирования. Использовали подвижную

фазу, состоящую из 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в воде с добавлением 5 мМ формиата аммония (А) и 0,1%-го раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (В). Градиентное элюирование: 0 мин – 2% В, 15 мин – 100% В, 20 мин – 100% В, 30 мин – 2% В. Скорость потока подвижной фазы 0,3 мл/мин. Температура хроматографической колонки 30 °С, объем вводимой пробы 20 мкл.

Использовали электрораспылительную ионизацию в устройстве «IonBooster» («Bruker Daltonics», Германия). Установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на щите капилляра и на капилляре 400 и 1000 В соответственно, давление газа распылителя 4,76 атм, поток газосушителя азота 6 л/мин, температура газосушителя азота 200 °С, поток газа-испарителя азота 250 л/ч, температура газа-испарителя азота 250 °С.

Т а б л и ц а 2

Основные характеристики макролидов, определяемых методом масс-спектрометрии высокого разрешения

Аналит	Брутто-формула	Ион	t_R , мин	Моно-изотопная масса, m/z	Δ , млн ⁻¹	LOD, нг/мл	LOQ, нг/мл
Азитромицин	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	8,5; 8,2	749,5158	3,5	0,02	0,07
Джозамицин	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₅	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	11,6 11,6	828,4818 850,4638	0,1 3,3	0,02	0,07
Кларитромицин	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	11,1 11,1	748,4842 770,4661	2,1 3,3	0,05	0,20
Рокситромицин	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	[M+H] ⁺	11,2	837,5318	2,6	0,05	0,20
Спирамицин I	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	[M+2H] ²⁺ [M+H] ⁺	8,6; 8,2 8,6; 8,2	422,2607 843,5213	1,1 -1,0	0,01	0,05
Спирамицин II	C ₄₅ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	[M+2H] ²⁺ [M+H] ⁺	8,7; 8,5 8,7; 8,5	443,2696 885,5318	2,0 -1,0	0,01	0,05
Спирамицин III	C ₄₆ H ₇₈ N ₂ O ₁₅	[M+2H] ²⁺ [M+H] ⁺	9,1; 8,9 9,1; 8,9	450,2774 899,5475	2,1 1,0	0,01	0,05
Тилмикозин	C ₄₆ H ₈₀ O ₁₃ N ₂	[M+H] ⁺	9,3; 9,2	869,5738	0,1	0,05	0,20
Тилозин	C ₄₆ H ₇₇ O ₁₇ N	[M+H] ⁺	10,3	916,5270	-4,1	0,05	0,20
Эритромицин А	C ₃₇ H ₆₇ O ₁₃ N	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	10,0; 9,7 10,0	734,4690 756,4583	4,7 -4,6	0,05	0,20
Тилвазолин	C ₅₃ H ₈₇ O ₁₉ N	[M+H] ⁺	12,3	1042,5945	4,5	0,10	0,30
Тулатромицин	C ₄₁ H ₇₉ O ₁₂ N ₃	[M+2H] ²⁺ [M+H] ⁺	7,6; 6,7 7,6; 6,7	403,7905 806,5737	3,3 -2,1	0,05 1,00	0,20 3,00

Диапазон регистрируемых значений массы ионов 300–1500 Да. В качестве калибранта использовали формиат натрия (10 мМ) в водном растворе изопропанола (1:1). Калибровку проводили в автоматическом режиме при регистрации положительных ионов в диапазоне от 3 до 4 мин.

Пробоподготовка. Пробоподготовку проводили одинаково для таких объектов анализа, как мясо (говядина, свинина, птица), молоко, печень, почки, яйца, рыба и мед. В центрифужную пробирку емкостью 15 мл вносили навеску измельченного и усредненного образца массой 1,00 г, добавляли 5,0 мл ацетонитрила и 100 мкл муравьиной кислоты, закрывали пробирки, смесь тщательно перемешивали в течение 2–3 мин и подвергали озвучиванию на ультразвуковой ванне в течение 5 мин. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при 5000 об/мин и температуре –4 °С. Отбирали 2,0 мл верхней части экстракта в пробирку емкостью 15 мл, добавляли 2,0 мл деионированной воды, перемешивали и фильтровали в микрофлакон через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Отбросив первые 1 мл фильтрата, полученный раствор хроматографировали.

Идентификация и определение. Идентификацию макролидов проводили с помощью программы TargetAnalysis-1.3 («Bruker Daltonics», Германия). Для обработки хроматограмм по общему ионному току и хроматограмм извлеченных масс ионов использовали программу DataAnalysis-4.1 («Bruker Daltonics», Германия). Для составления картины изотопного

Т а б л и ц а 3

Идентификационные параметры

Параметр	Установленное значение
Время удерживания, мин (табл. 1)	±0.3
Масса моноизотопа, мДа (табл. 1)	±10
Сопоставление изотопного распределения, $mSigma$ (рис. 3)	<50

распределения аналитов использовали программу IsotopePattern («Bruker Daltonics», Германия).

Определение идентифицированных макролидов проводили методом стандартной добавки. Расчет концентрации аналита в пробе проводили по формуле:

$$c_x = c_{\text{доб.}} \cdot (S_{x+\text{доб.}} / S_x - 1),$$

где c_x , $c_{\text{доб.}}$ – концентрация аналита без добавки

и с добавкой аналита; S_x , $S_{x+\text{доб.}}$ – площадь хроматографических пиков (пиков m/z) аналита без добавки и с добавкой стандарта аналита.

Результаты и их обсуждение

Идентификация. Все исследуемые макролиды в условиях электрораспылительной ионизации образуют протонированные формы $[M+H]^+$, джозамицин, кларитромицин и эритромицин А –

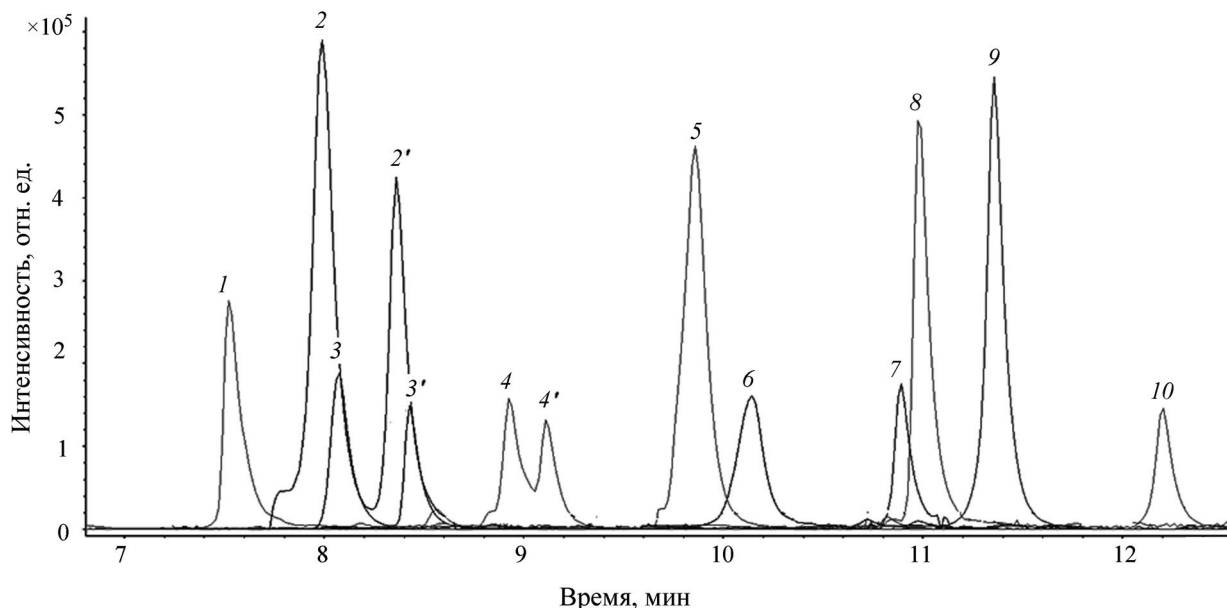


Рис. 1. Масс-хроматограммы экстракта говядины, обогащенной макролидами до концентрации 100 нг/г: 1 – тулатромицин; 2, 2' – спирамицин; 3, 3' – азитромицин; 4, 4' – тилмикозин; 5 – эритромицин А; 6 – кларитромицин; 8 – рокситромицин; 9 – джозамицин; 10 – тилвазолин

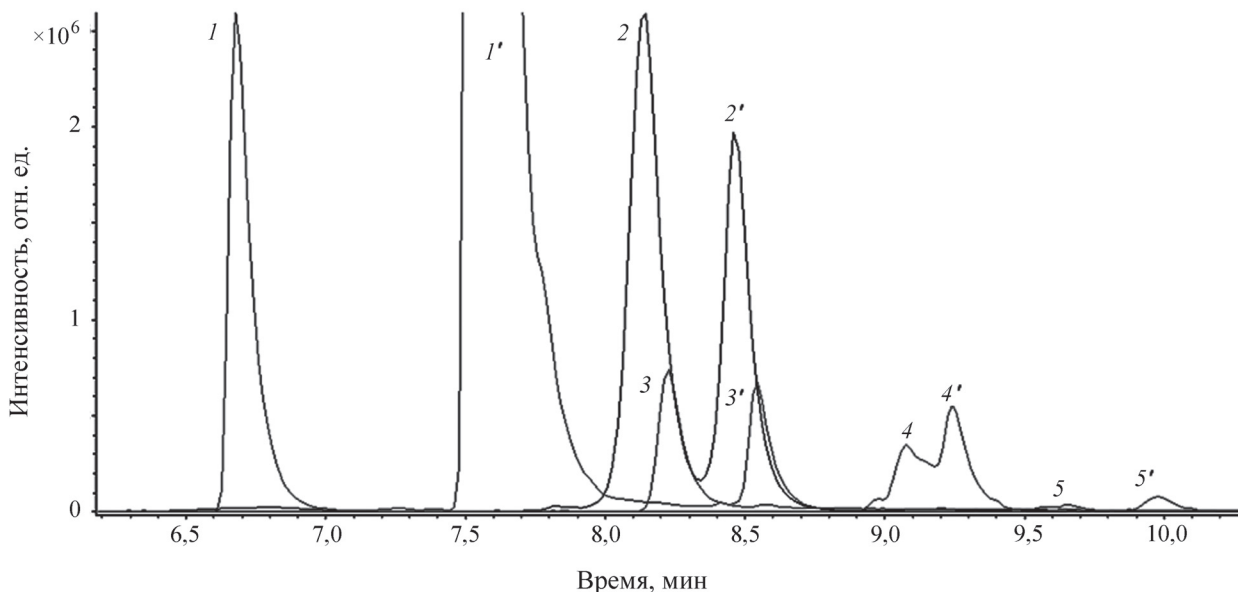


Рис. 2. Масс-хроматограммы изомерных форм макролидов в меде, обогащенном антибиотиками до концентрации 100 нг/г: 1, 1' – тулатромицин; 2, 2' – спирамицин; 3, 3' – азитромицин; 4, 4' – тилмикозин; 5, 5' – эритромицин А

аддукты с натрием $[M+Na]^+$, спирамицины I–III и тулатромицин – двухзарядные ионы $[M+2H]^{2+}$ (табл. 2, рис. 1). Установлено, что спирамицин, азитромицин, тилмикозин, эритромицин и тулатромицин могут образовывать в анализируемых продуктах изомерные формы, время удерживания которых отличается от времени удерживания основной формы (рис. 2). Погрешность в определении масс ионов не превышала $\pm 5 \text{ млн}^{-1}$ ($n = 3$).

Для идентификации антибиотиков использовали программу TargetAnalysis. Идентификационными параметрами служили время удерживания, точность массы иона (m/z) и $mSigma$ (табл. 3). Важный параметр $mSigma$ – соответствие теоретического изотопного распределения практическому. На рис. 3 представлен сгенерированный программой IsotopePattern масс-спектр джозамицина. Как видно из рис. 3,

характер и картина форм изотопных отношений полностью совпадают.

Определение. Пределы обнаружения (LOD) и пределы определения (LOQ) рассчитывали для стандартных растворов (табл. 2) и растворов с добавками макролидов (табл. 4) при соотношениях сигнал/шум, равных 3 и 10. Как следует из табл. 2, 4, пределы обнаружения близки между собой, что может свидетельствовать о незначительном матричном эффекте при извлечении макролидов из 1 г пробы ацетонитрилом (5 мл) и разбавлении последнего в два раза водой. Пределы определения макролидов составили 0,04–2 нг/г (табл. 4).

В данной работе предложено определять обнаруженные макролиды методом стандартной добавки [15]. Данный метод имеет следующие преимущества перед методом внешнего стан-

Таблица 5

Оценка правильности методики определения макролидов ($n = 3$, $P = 0,95$) методом стандартной добавки для различных матриц. В скобках указано значение относительного стандартного отклонения (s_r , %)

Добавка, нг/г	1	10	50	100	200
Найдено					
Азитромицин	0,9±0,2 (16)	11±2 (12)	48±2 (2,9)	111±10 (6,3)	201±8 (2,7)
Джозамицин	0,85±0,10 (8,2)	9±1 (7,7)	51±4 (5,4)	105±8 (5,3)	211±12 (3,9)
Рокситромицин	1,3±0,4 (21)	12±3 (17)	48±3 (4,3)	98±7 (5,0)	222±18 (5,6)
Спирамицин	1,2±0,3 (23)	13±3 (16)	53±2 (2,6)	121±12 (7,5)	205±6 (2,0)
Тилмикозин	0,91±0,05 (4,1)	10±2 (14)	49±2 (2,9)	109±9 (5,8)	214±7 (2,2)
Тилозин	0,87±0,06 (5,2)	13±4 (21)	47±4 (3,8)	111±11 (6,9)	213±9 (3,0)
Эритромицин	1,1±0,3 (19)	12±2 (11)	48±4 (4,8)	106±6 (3,9)	206±10 (3,4)
Кларитромицин	1,4±0,5 (20)	11±3 (19)	54±3 (3,9)	98±10 (7,1)	214±9 (2,9)
Тилвалозин	0,95±0,05 (3,7)	11±1 (6,3)	50±2 (2,8)	117±11 (6,5)	215±13 (4,2)
Тулатромицин	1,3±0,4 (21)	11±2 (12)	48±4 (5,8)	111±9 (5,6)	202±11 (3,8)

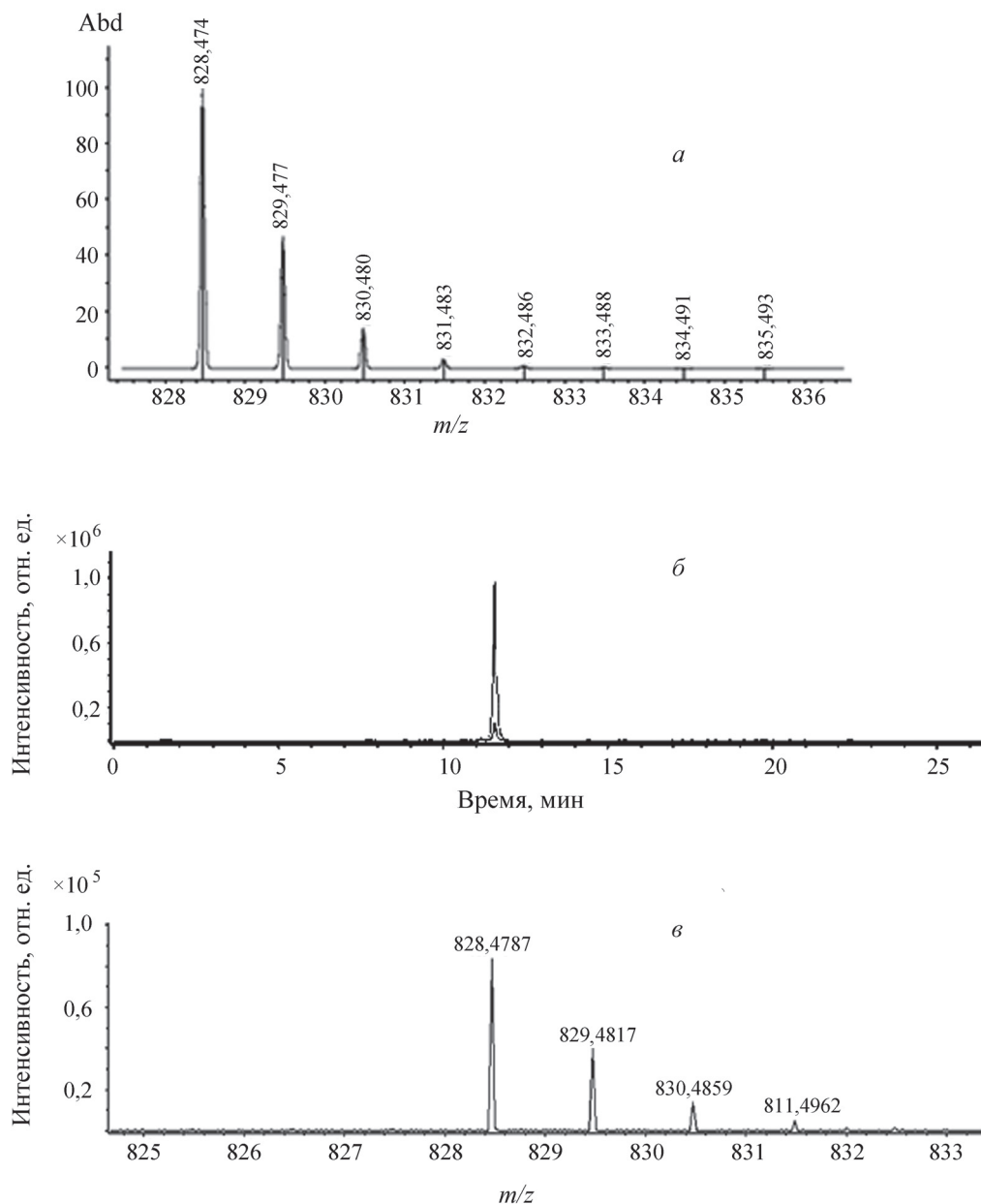


Рис. 3. Масс-спектр джоамицина (а), практически зарегистрированная масс-хроматограмма аддуктов джоамицина $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ (б) и масс-спектр джоамицина для экстракта из меда (в)

дарта (градуировочной характеристики). Во-первых, нет необходимости устанавливать степень извлечения аналитов; во-вторых, требуется меньше дорогостоящих стандартных образцов сравнения и не требуется периодической проверки стабильности градуировочных характеристик; в-третьих, повышается точность определения и, в-четвертых, нивелируется матричный эффект.

Как известно, прием однократной стандартной добавки действует в области линейной за-

висимости площади хроматографического пика (m/z) от концентрации аналита. Установлено, что линейная зависимость для макролидов наблюдается от LOQ до 400 нг/г.

Схема анализа включает идентификацию макролидов, добавление аналита X (в случае обнаружения последнего) в пробу и повторение анализа. Для повышения точности определения необходимо 2–3-кратное увеличение площади хроматографического пика (m/z) [15]. При расчете площади аналита следует учитывать и суммиро-

вать основную площадь с площадью изомерных форм спирамицина, азитромицина, тилмикозина и эритромицина.

В табл. 5 представлены результаты проверки правильности определения макролидов в продуктах питания методом стандартной добавки. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 21%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Codony R., Compano R., Granados M., Garcia-Regueiro J.A., Prat M.D. // J. Chromatogr. A. 2002. Vol. 959. P. 131.
2. Wang J. // J. Agric. Food Chem. 200. Vol. 52. P. 171.
3. Wang J., Leung D., Butterworth F. // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53. P. 1857.
4. Berrada H., Borrull F., Font G., Molto J.C., Marce R.M. // J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1157. P. 281.
5. Scheuch E., Spieker J., Venner M., Siegmund W. // J. Chromatogr. B. 2007. Vol. 850. P. 464.
6. Aguilera-Luiz M.M., Vidal J.L.M., Romero-Gonzalez R.R., Frenich A.G. // J. Chromatogr. A. 2008. Vol. 1205. P. 10.
7. Berrada H., Borrull F., Font G., Molto J.C., Marce R.M. // J. Chromatogr. A. 2008. Vol. 1208. P. 83.
8. Senta I., Terzic S., Ahel M. // Chromatographia. 2008. Vol. 68. P. 747.
9. Pedrouzo M., Borrull F., Marce R.M., Pocurull E. // J. Sep. Sci. 2008. Vol. 31. P. 2182.
10. Chen K.Y., Yang T.C., Chang S.Y. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012. Vol. 23. P. 1157.
11. Wu J., Qian Y., Zhang C., Zheng T., Chen L., Lu Y., Wang H. // Food Anal. Methods. 2013. DOI: 10.1007/s12161-013-9563-2.
12. Amelin V.G., Krasnova T.A. // J. Analyt. Chem. 2015. Vol. 70. No. 7. P. 850. DOI: 10.1134/S1061934815070023.
13. Jank L., Martins M.T., Arsand J.B., Motta T.M.C., Hoff R.B., Barreto F., Pizzolato T.M. // Talanta. 2018. Vol. 144. P. 686. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.06.078.
14. Wang Z., Song X., Zhou T., Bian K., Zhang F., He L., Liu Q. // RSC Adv. 2015. Vol. 5. P. 1491. DOI: 10.1039/c4ra12623h.
15. Zenkevich I.G., Klimova I.O. // J. Anal. Chem. 2006. Vol. 61, No. 10. P. 967. DOI: 10.1134/S1061934806100042.

Поступила в редакцию 10.06.2018
Получена после доработки 10.07.2018
Принята к публикации 15.11.2018

SIMPLE PREPARATION, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF TWELVE MACROLIDS WITH A STANDARD ADDITIVE IN FOOD RAW MATERIAL AND FOODSTUFFS BY MASS-SPECTROMETRY OF HIGH-RESOLUTION

V.G. Amelin^{1,2,*}, D.S. Bol'shakov²

(¹Vladimir State University; ²Federal Center for Animals Health; *e-mail: amelinvg@mail.ru)

A simple method for extraction, identification and determination 12 antibiotics-macrolides (azithromycin, roxithromycin, josamycin, spiramycin I–III, filmicodin, tylosin, erythromycin, clarithromycin, tilozoline and tulatromycin) in food raw materials and foodstuffs using high-resolution time-of-flight mass spectrometry is proposed. The ranges of the macrolide content determined were 1–400 ng/g, detection limits were 0,01–0,5 ng/g, determination limits were 0,04–2 ng/g. A scheme for the identification and detection of detectable antibiotics by the standard addition method is proposed. The relative standard deviation of the analysis results does not exceed 21%. Duration of screening of samples 40 min, the determination time of detected antibiotics is 1–1,5 h.

Key words: antibiotics-macrolides, foodstuffs, high-performance liquid chromatography, high-resolution time-of-flight mass spectrometry.

Сведения об авторах: Амелин Василий Григорьевич – профессор кафедры химии Института биологии и экологии Владимирского государственного университета имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, вед. науч. сотр. лаборатории химического анализа ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), докт. хим. наук (amelinvg@mail.ru); Большаков Дмитрий Сергеевич – ст. науч. сотр. лаборатории химического анализа ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), канд. хим. наук (bolshakovina@mail.ru).