

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-8-12-22>

СКРИНИНГ ПРОБ И ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ СОДЕРЖАНИЙ 80 ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

© **Василий Григорьевич Амелин***, **Илья Вадимович Батов**,
Ольга Игоревна Лаврухина, **Алексей Викторович Третьяков**,
Леонид Карольевич Киш

Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Россия, 123022, Москва, Звенигородское шоссе, д. 5; *e-mail: amelinvg@mail.ru

*Статья поступила 14 апреля 2023 г. Поступила после доработки 24 апреля 2023 г.
Принята к публикации 25 мая 2023 г.*

Предложен экспрессный способ скрининга проб и определения остаточных содержаний 80 ветеринарных препаратов в пищевых продуктах при оценке их безопасности. В пробоподготовке исключена стадия твердофазной экстракции для очистки экстракта, при этом матричный эффект нивелирован применением изотопно-меченых стандартов. Применение способа изотопного разбавления позволило исключить стадию построения матричных градуировочных зависимостей и рассчитывать концентрации с использованием поправочных коэффициентов, найденных по стандартным водным растворам аналитов с ограниченным числом изотопно-меченых стандартов (по одному для каждого класса определяемых соединений). Пределы обнаружения лекарственных препаратов ($c_{\min} = 0,1 - 10$ нг/г) позволили определять их остаточные количества на уровне максимально-допустимых содержаний для пищевых продуктов.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; tandemная масс-спектрометрия; метод изотопного разбавления; скрининг проб; остаточные содержания ветеринарных препаратов.

SCREENING AND SIMULTANEOUS DETERMINATION OF 80 VETERINARY DRUGS RESIDUES IN FOOD BY HPLC-MS/MS

© **Vasiliy G. Amelin***, **Ilya V. Batov**, **Olga I. Lavrukhina**,
Alexey V. Tretyakov, **Leonid K. Kish**

The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, 5, Zvenigorodskoye shosse, Moscow, 123022, Russia; *e-mail: amelinvg@mail.ru

Received April 14, 2023. Revised April 24, 2023. Accepted May 25, 2023.

A fast method of samples screening and determination of 80 veterinary drugs residues in food safety assessment is proposed. The solid-phase extraction for the extract purification in the sample preparation is excluded, at the same time the matrix effect is mitigated by the isotope-labeled standards using. The isotope dilution method allowed to exclude matrix calibration curves construction and calculate the concentration using correction coefficients found from analytes standard aqueous solutions and a limited number of isotope-labeled standards. The drugs residues limits of detection ($c_{\min} = 0,1 - 10$ ng/g) allowed their determination at the maximum permissible levels for food.

Keywords: high performance liquid chromatography; tandem mass spectrometry; isotopic dilution; samples screening; veterinary drugs residues.

Введение

В лабораторных исследованиях пищевой продукции и продовольственного сырья по показателям безопасности значительную роль играет производительность анализа. В продукции животноводства необходим контроль остаточных содержаний широкого спектра препаратов (сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов,

антибиотиков тетрациклиновой группы, макролидов, хинолонов, β -агонистов и др.). Скрининг подразумевает исследование большого числа проб в рамках одного анализа на максимально широкий перечень показателей, позволяющее выявить несоответствия продукции регламентированным требованиям. В этом случае эффективным инструментом являются методики одновре-

менного определения остаточных содержаний лекарственных препаратов различных классов для ветеринарного применения и их метаболитов на основе хроматографических методов с tandem-масс-спектрометрическим детектированием [1]. Высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) и предварительной подготовкой образцов методом твердофазно-, жидкость-жидкостной экстракции (ТЖЭ, ЖЖЭ) в сочетании с последующей очисткой твердофазной экстракцией (ТФЭ), дисперсионной твердофазной экстракцией (ДТФЭ), а также QuEChERS, широко применяют в многокомпонентном анализе [2].

В режиме МС/МС идентификацию и определение проводят путем измерения соотношений m/z иона-предшественника и дочерних ионов [3]. Сочетание в методе ВЭЖХ-МС/МС разделения анализируемых веществ и возможности получения информации об их структуре обеспечивает однозначную идентификацию и надежное определение аналитов. Разработаны чувствительные методики, которые позволяют одновременно идентифицировать и определять множество соединений разных классов (табл. 1).

Несмотря на высокую селективность ВЭЖХ-МС/МС, определение ветеринарных препаратов в продовольственном сырье и продуктах питания требует сложной пробоподготовки. Поэтому для повышения производительности анализа необходима минимизация числа операций и продолжительности подготовки образцов, но при этом эффективное устранение (нивелирование) матричного эффекта. В случае tandem-масс-спектрометрического детектирования достаточно применения ТЖЭ, ЖЖЭ и последующего разбавления экстракта, а нивелировать влияние матрицы можно добавлением изотопно-меченых внутренних стандартов. Необходимо отметить, что задача скрининга решается эффективно и хроматографическими методами в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения, но соответствующее оборудование доступно не всем лабораториям в связи с высокой стоимостью.

Цель данной работы заключалась в разработке ВЭЖХ-МС/МС методики с минимальной предварительной пробоподготовкой для скрининга проб и определения остаточных количеств широкого спектра лекарственных препаратов ветеринарного назначения с использованием метода изотопного разбавления.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Хроматографическое разделение проводили с использованием ультравысокоэффективного жидкостного хроматографа

(УВЭЖХ) 1290 Infinity II LC System (Agilent, Санта-Клара, США) с колонкой Zorbax SB-C18 (150 × 2,0 мм, 5 мкм).

Аналиты идентифицировали с помощью масс-спектрометрической трехквadrupольной системы QTrap 5500 (Sciex, Торонто, Канада). Использовали версию программного обеспечения Analyst Software 1.6.2. Система работала в режиме мониторинга заданных реакций положительных и отрицательных ионов с ионизацией молекул электрораспылением.

Реактивы. Использовали стандартные образцы тетрациклинов, макролидов, линкозамидов, плевомутилинов, сульфаниламидов, пенициллинов, нитроимидазолов, амфениколов, хинолонов и β -агонистов и соответствующие дейтерированные стандарты (содержание основного вещества не менее 90 %, Dr. Ehrenstorfer, Fluka, Sigma-Aldrich). Исходные растворы с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением соответствующей навески (с учетом содержания основного вещества) в метаноле (кроме растворов пенициллинов — их растворяли в смеси вода — метанол в объемном отношении 2:1). Хранили растворы при –20 °С не более 1 года. Рабочие растворы готовили разбавлением исходных растворов водой в день использования.

Для пробоподготовки и хроматографического разделения использовали ацетонитрил LC-MS grade (Scharlau, Барселона, Испания), метанол LC-MS grade (Merck, Дармштадт, Германия), муравьиную кислоту (чистота >98 %) (Carl Roth, Карлсруэ, Германия), натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия). Деионизованную воду получали с помощью установки для высокоэффективной очистки воды Direct-Q S (Millipore, Мольсайд, Франция).

Расходные материалы. В работе использовали полипропиленовые пробирки емк. 15 мл (Corning, Глендейл, США), нейлоновые мембранные фильтры 0,20 мкм (Agilent, Санта-Клара, США), микрофлаконы для хроматографирования емк. 2 мл (ALWSCI Technologies Co., Шаосин, Китай).

Пробы. Анализируемые пробы были получены ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ») в рамках государственного ветеринарного лабораторного мониторинга, осуществляемого Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). Мясо, печень, почки, шпик хранили при –20 °С в холодильнике в течение месяца. Перед анализом замороженные продукты измельчали с использованием бытового миксера; молоко, мед, яйца хранили при 4 °С в течение месяца. Перед анализом

Таблица 1. Характеристики ВЭЖХ-МС/МС методик одновременного определения ветеринарных препаратов
Table 1. Characteristics of HPLC-MS/MS in simultaneous determination of veterinary drugs

Число определяемых аналитов	Объект анализа	Пробоподготовка/степень извлечения, %	Колонка	Продолжительность хроматографирования, мин	Предел обнаружения/определения (мкг/кг, мкг/л)	Литература
13	Молоко	QuEChERS/62 – 125	XTerra C18 (50 × 3 мм, 3,5 мкм)	20	0,3 – 16,6/1,0 – 50,0	[4]
18	Молоко, курица, свинина, говядина	QuEChERS/73,9 – 135	Acclaim Polar Advantage II C18 (150 × 2,1 мм, 3 мкм)	26	0,1 – 0,21/0,03 – 0,66	[5]
23	Рыба и мясо	ТЖЭ/82 – 119	Phenomenex Aqua C18 (150 × 2,1 мм, 3 мкм)	18	0,3 – 15,0/0,8 – 45,3	[6]
26	Молоко	QuEChERS/75 – 120	Symmetry C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм)	10	—/8,0 – 12,0	[7]
63	Курица	ТЖЭ + ТФЭ-очистка/83 – 117	Acclaim 120 C18 (100 × 2,1 мм, 3 мкм)	12	0,01 – 0,3/0,02 – 1	[8]
64	Яйца	ЖЖЭ + ТФЭ-очистка/70,8 – 116,1	Proshell 120 EC-C18 (100 × 2,1 мм, 2,7 мкм)	19	0,005 – 2,00/0,015 – 6,00	[9]
85	Лизофилизованный яичный белок	ТЖЭ + ТФЭ-очистка/84 – 110	Halo C8 (100 × 2,1 мм, 2,7 мкм)	25	—	[10]
112	Мясо	ТЖЭ + ДТФЭ-очистка/95,6 – 101,0	XSelect HHS T3 (150 × 3 мм, 2,5 мкм)	25	0,2 – 13,6/0,9 – 48,0	[11]
115	Молоко, масло, рыба, яйца	ЖЖЭ, ТЖЭ + низкотемпературная очистка/50 – 120	Atlantis T3 C18 (100 × 2,1 мм, 3 мкм)	25	0,008 – 0,88/0,03 – 2,6	[12]
120	Мясо, яйца, молоко	ТЖЭ, ЖЖЭ + ТФЭ-очистка	Hypersil Gold C18 (150 × 2,1 мм, 5 мкм)	60	0,5 – 3,0/1,5 – 10,0	[13]
132	Молоко	ЖЖЭ + магнитная ДТФЭ/72 – 120	Acclaim 120 C18 (100 × 2,1 мм, 3 мкм)	25	0,015 – 0,3/0,05 – 1	[14]

яйца освобождали от скорлупы, объединяли 6 штук в одну пробу и тщательно перемешивали с использованием бытового миксера.

Пробоподготовка. При анализе образцов мяса, мясных продуктов, субпродуктов и яиц в полипропиленовую пробирку емк. 15 мл вносили 2,00 г тщательно измельченной пробы, добавляли 10,0 мл смеси 0,05 М раствора ЭДТА и ацетонитрила (20:80 % об.), перемешивали в течение 10 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин (4000 об/мин) при 4 °С. Отбирали жидкий слой в новый флакон и упаривали при 40 °С в токе азота до 0,8 – 0,9 мл. Далее объем экстракта доводили деионизированной водой до 1 мл, перемешивали 5 с и фильтровали через мембранный фильтр 0,20 мкм в микрофлакон для хроматографирования.

При анализе образцов молока и молочных продуктов в полипропиленовую пробирку емк. 15 мл вносили 2,00 г тщательно перемешанной пробы, добавляли 8 мл ацетонитрила и 40 мг ЭДТА, перемешивали в течение 10 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин (4000 об/мин) при 4 °С. Отбирали верхний слой в новый флакон и упаривали при 40 °С в токе азота до 0,8 – 0,9 мл. Далее объем экстракта доводили деионизированной водой до 1 мл, перемешивали 5 с и фильтровали через мембранный фильтр 0,20 мкм в микрофлакон для хроматографирования.

Идентификация и определение. Аналиты идентифицировали по полученным хроматограммам с использованием программного обеспечения Analyst 1.6.2 (ABSciex, Фреймингем, США). Неизвестную концентрацию аналита в пробе определяли методом изотопного разбавления. В анализируемую пробу вводили смесь

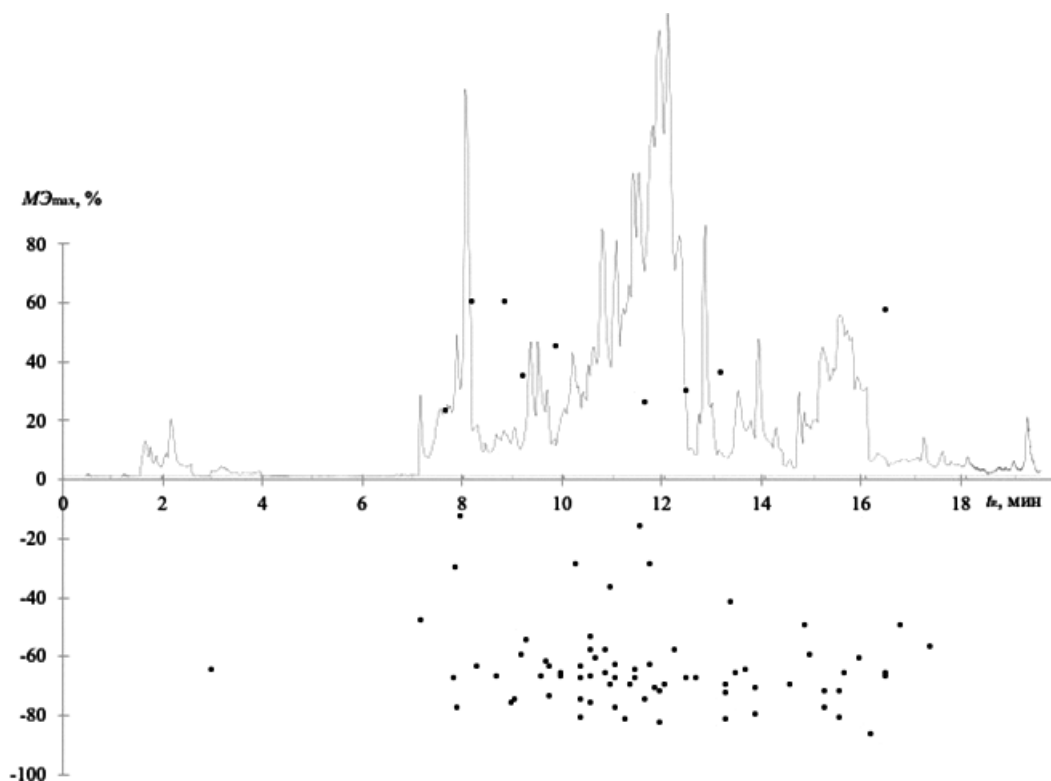


Рис. 1. Хромотограмма по общему ионному току для экстракта из печени (меда) и максимальный матричный эффект, распределенный по времени удерживания аналитов

Fig. 1. Chromatogram of the total ion current for the liver (honey) extract and the maximum matrix effect distributed by the analytes retention times

дейтерированных внутренних стандартов (5 – 50 нг/г), проводили анализ и концентрацию рассчитывали с использованием поправочных коэффициентов для каждого аналита (табл. 2):

$$c_x = c_{\text{доб}} S_x k / S_{\text{в.ст.х}},$$

где $c_{\text{доб}}$ — концентрация добавки внутреннего стандарта, нг/г; S_x , $S_{\text{в.ст.х}}$ — площади хроматографических пиков обнаруженного аналита в пробе и соответствующего данному классу аналитов внутреннего стандарта соответственно; k — поправочный коэффициент.

Поправочные коэффициенты (среднее значение) были предварительно рассчитаны для уровней концентраций 1, 10, 20, 50 и 100 нг/мл по соотношениям площадей пиков дейтерированных стандартов и стандартных растворов аналитов:

$$k = S_d / S_0,$$

где S_d , S_0 — площади хроматографических пиков внутреннего дейтерированного стандарта и аналита соответственно. Определение поправочного коэффициента для различных матриц (мясо, печень, молоко, мед, яйца, рыба) проводили аналогично введением в «чистые» пробы 1, 10, 20, 50 и 100 нг/г дейтерированных и недейтерированных

стандартов. Проводили пробоподготовку как описано выше, хроматографировали и по хроматограммам определяли S_d , S_0 .

Матричный эффект (%) оценивали по формуле:

$$\text{МЭ} = 100(C/D - 1),$$

где C , D — значения наклонов градуировочных графиков, полученных для экстрактов из матрицы и деионизированной воды соответственно в диапазоне 0,1 – 100 мкг/кг.

Условия хроматографического разделения и детектирования. В качестве подвижных фаз А и Б использовали 0,5 %-ные водный и метанольный растворы муравьиной кислоты соответственно. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин. Осуществляли градиентное элюирование: 0 – 1 мин — 100 % А, 1 – 17 мин — градиентное уменьшение до 0 % А, 17 – 20 мин — 0 % А, 20 – 20,1 мин — 100 % А, 20,1 – 25 мин — уравнивание колонки (100 % А). Температура хроматографической колонки составляла 40 °С, объем вводимой пробы — 10 мкл.

Параметры работы масс-спектрометрического детектора: температура испарителя — 500 °С; напряжение на распыляющем капилляре — 5500 – 4500 В; давление газа соударений (азо-

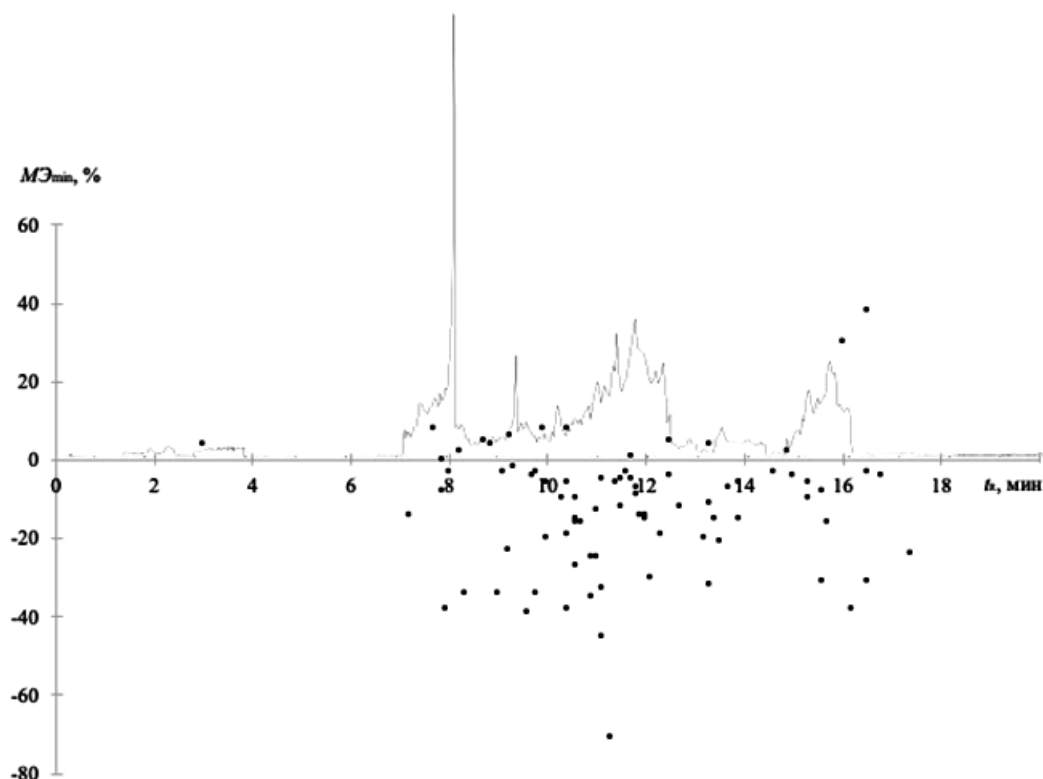


Рис. 2. Хроматограмма по общему ионному току для экстракта из молока (мяса) и минимальный матричный эффект, распределенный по времени удерживания аналитов

Fig. 2. Chromatogram of the total ion current for the milk (meat) extract and the minimum matrix effect distributed by the analytes retention times

та) — 41,37 кПа, осушающего и распыляющего газов — 275,79 кПа, завеса — 137,90 кПа.

Обсуждение результатов

Выбор условий пробоподготовки без очистки экстракта методом ТФЭ осуществляли для получения минимального матричного эффекта. Установлено, что при данных условиях матричный эффект максимален для печени и меда ($>-80\%$), минимален для молока, мяса различных животных ($>-40\%$). На рис. 1, 2 представлены хроматограммы экстрактов различных образцов и рассчитанные значения матричного эффекта. Как видно из рис. 1 и 2, значительное влияние матрица оказывает как раз в области времени удерживания исследуемых аналитов (7–17 мин). Для нивелирования такого матричного эффекта при определении концентраций аналитов применяли изотопно-меченые стандарты и прием изотопного разбавления.

В табл. 2 представлены аналитические характеристики определения восьмидесяти ветеринарных препаратов. Как видно из таблицы, поправочный коэффициент k имеет практически одинаковые значения для водных растворов аналитов и растворов различных матриц (молоко, мясо, субпродукты и пр.). Этот факт позволил

нам не использовать матричные градуировочные зависимости, как указано в ГОСТ [15–19], а рассчитать концентрации аналитов с применением метода изотопного разбавления. Кроме того, в ГОСТ [15, 17–19] для различных классов аналитов предписано применение нескольких изотопно-меченых стандартов, что, на наш взгляд, нерационально: мы предлагаем для каждого класса рассматриваемых соединений использовать один изотопно-меченый стандарт. Поправочный коэффициент k_1 в табл. 2 соответствует определяемым аналитам одного класса с одним изотопно-меченым стандартом, который указан в скобках после названия класса определяемых соединений в табл. 2.

В соответствии с разработанной методикой проводили скрининг проб пищевых продуктов на рассматриваемые аналиты. В случае выявления какого-либо соединения определяли его содержание расчетным способом, используя метод изотопного разбавления. В табл. 3 представлены некоторые результаты определения при выявлении остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах. Как видно из таблицы, полученные результаты хорошо согласуются с результатами анализа по ГОСТ. Следует отметить, что при использовании данного способа скрининга проб и определения ветеринарных препаратов существ-

Таблица 2. Основные характеристики идентификации и определения ветеринарных препаратов
Table 2. General characteristics of veterinary drugs identification and determination

Аналит	Ион-предшественник, <i>m/z</i>	Дочерние ионы, <i>m/z</i>	Время удерживания, <i>t_R</i> , мин	Потенциал декарбонизации, В	Энергия столкновений, эВ	МЭ, % мин/макс	<i>k</i> вода/матрица (среднее значение)	<i>k</i> ₁ (среднее значение)	<i>c</i> _{мин} , мкг/кг
Сульфаниламиды (Сульфадиазол-D4)									
Сульфадиазин	251,1	156,1/108,1	8,7	50	20/31	+5/-67	0,34/0,30	1,61	1,0
Сульфатуанидин	215,1	156,1/60	3,0	50	19/19	+4/-65	2,03/1,94	2,21	1,0
Сульфациридин	250,1	156,1/184,1	9,3	50	24/25	-2/-55	0,39/0,32	0,62	1,0
Сульфадиазин-D4	257,1	162,1	8,7	50	23/15	+5/-67			
Сульфаметазин	279,1	186,1/124,1	10,6	50	23/31	-15/-67	0,75/0,77	0,53	0,5
Сульфаметразин	265,1	156,1/110,1	9,7	50	25/32	-4/-62	2,40/2,80	0,72	0,5
Сульфаклорпиридазин	285,1/287,1	156,1/156,1	11,4	50	23/22	-6/-70	4,15/4,94	3,21	0,5
Сульфадиметоксин	311,1	245,1/156,1	13,3	50	28/30	-11/-73	2,27/2,16	1,23	
Сульфаметизол	271,1	156,1/108,1	10,6	50	21/34	-27/-58	1,68/1,24	0,53	1,0
Сульфаметоксипиридазин	281,1	156,1/108,1	10,9	50	24/38	-35/-58	0,91/1,13	1,24	0,5
Сульфазтоксипиридазин	295,1	156,0/92,0	12,5	50	23/41	-4/-68	0,86/0,91	1,00	0,5
Сульфаметазин-D4	285,1	186,1	10,6	50	25/15	-15/-67			
Сульфацинокалин	301,1	156,1/146,1	13,7	50	24/30	-7/-65	0,38/0,41	3,03	1,0
Сульфаметоксазол	254,1	156,1/108,1	11,5	50	22/34	-12/-65	0,76/0,77	2,73	5,0
Сульфаметоксазол-D4	260,1	162,1	11,5	50	24/12	-12/-65			
Сульфатиазол	256,1	156,1/108,1	9,09	50	22/33	-3/-75	0,76/0,83	0,84	0,5
Сульфизоксазол	268,1	156/, 1/113,1	10,4	50	19/22	+8/-68	0,32/0,38	0,43	0,5
Сульфамоксол	268,1	156,1/113,1	10,4	50	22/29	-19/-64	0,46/0,48	0,54	0,5
Сульфадоксин	311,1	156,0/108,1	13,3	50	26/36	+4/-70	0,19/0,22	0,23	0,5
Сульфатиазол-D4	262,1	162,1	9,1	50	23/15	-3/-75			
Триметоприм	291,1	230,0/123,0	9,77	50	34/30	-34/-64	0,61/0,66	0,75	0,5
Триметоприм-D9	300,3	123,1	9,8	50	25/9	-34/-64			
Нитроимидазолы (Ипронидазол-D3)									
Гидроксиметилметил-нитроимидазол	158,1	140,0/94,0	7,88	50	16/30	0/-30	0,51/0,57	2,91	1,0
Гидроксиметилметил-нитроимидазол-D3	161,1	143,0	7,9	50	16/19	0/-30			
Метронидазол	172,1	128,0/82,0	7,93	50	18/31	-38/-78	0,89/0,91	0,53	0,5
Гидроксиметронидазол	188,1	123,0/126,0	7,18	50	16/23	-14/-48	1,38/1,33	0,91	1,0
Метронидазол-D4	176,1	132,1	7,9	50	18/20	-38/-78			

Аналит	Ион-предшественник, <i>m/z</i>	Дочерние ионы, <i>m/z</i>	Время удерживания, <i>t_R</i> , мин	Потенциал декартеризации, В	Энергия столкновений, эВ	МЭ, % мин/макс	<i>k</i> вода/матрица (среднее значение)	<i>k</i> ₁ (среднее значение)	<i>c</i> _{мин} , мкг/кг
Пенициллины (Пенициллин G-D7)									
Ронидазол	201,1	140,0/55,0	8,87	50	15/27	+4/+60	0,88/0,90	3,51	1,0
Тернидазол	186,1	128,0/82,0	9,25	50	20/33	+6/+35	0,47/0,46	0,74	0,5
Диметридазол	142,1	96,0/81,0	8,21	50	22/35	+2/+60	0,92/0,89	1,32	0,5
Тинидазол	248,1	121,0/93,0	9,9	50	20/25	+8/+45	0,47/0,41	0,64	0,5
Ронидазол-D3	204,1	143,0	8,9	50	15/9	+4/+60			
Гидроксипронидазол	186,1	168,0/122,0	11,7	50	18/27	+1/+26	0,09/0,13	0,91	1,0
Гидроксипронидазол-D3	189,1	171,0	11,7	50	27/9	+1/+26			
Ипронидазол	170,1	109,0/124,0	12,5	50	31/24	+5/+30	0,78/0,74	1,32	1,0
Ипронидазол-D3	173,1	127,0	12,5	50	24/9	+4/+34			
Тетрациклины (Демеклоциклин)									
Ампициллин	350,1	192,1/106,1	11,1	50	22/26	-33/-68	1,58/1,68	1,53	1,0
Амоксициллин	366,1	208,1/114,1	8,32	50	18/30	-34/-64	4,98/6,93	3,82	5,0
Пенициллин G-D7	342,1	183,1	15,7	50	18/15	-16/-66			
Клоксациллин (-)	434,1	390,1/293,1	16,8	-35	-10/-16	-4/-50	5,51/5,65	0,14	10,0
Диклоксациллин (-)	468,1	424,1/327	17,4	-55	-11/-16	-24/-57	4,40/4,24	0,93	5,0
Пенициллин G (-)	333,1	192,0/289,0	15,7	-60	-16/-11	-16/-66	2,28/2,39	0,33	5,0
Пенициллин V (-)	349,2	208,0/305,0	16,5	-60	-14/-11	-31/57	1,26/1,17	0,74	10,0
Оксациллин (-)	400,1	259,0/356,0	16,5	-55	-18/-12	-3/-67	0,25/0,26	0,53	10,0
Пенициллин G-D7 (-)	340,1	199,0	15,7	-66	-15	-10/-60			
Макролиды (Азитромицин-D3)									
Тетрациклин	445,2	410,2/427,2	10,4	70	25/18	-6/-75	0,49/0,43	0,45	1,0
Окситетрациклин	461,2	444,2/462,1	10,6	70	21/26	-16/-76	2,83/2,92	2,93	1,0
Доксициклин	445,2	428,2/410,1	13,3	70	23/32	-32/-82	0,46/0,49	0,51	1,0
Хлортетрациклин	479,1	444,1/462,1	12,1	70	28/22	-30/-70	1,06/1,02	1,04	1,0
Демеклоциклин	465,1	448,1	10,7	70	22/12	-25/-70			
Спирамицин	422,3	100,9/174,1	12,0	70	22/25	-15/-83	3,27/3,22	0,42	0,5
Тилмикозин	869,6	696,3/174,2	13,2	70	57/53	-20/36	2,51/2,46	1,43	0,5
Тулаграмин	806,6	577,3/158	10,3	70	33/48	-10/-29	2,80/2,60	0,83	0,5
Азитромицин-D3	752,7	594,5	12,1	70	39/20	-21/-30			
Эритромицин	734,5	158,0/576,2	15,0	70	35/27	-4/-60	0,32/0,29	0,63	0,5

Аналит	Ион-предшест- венник, <i>m/z</i>	Дочерние ионы, <i>m/z</i>	Время удерживания, <i>t_R</i> , мин	Потенциал декастериза- ции, В	Энергия столкнове- ний, эВ	МЭ, % мин/макс	<i>k</i> вода/ матрица (среднее значение)	<i>k</i> ₁ (среднее значение)	<i>c</i> _{мин} , мкг/кг
Линкозамиды (Клиндамицин-D3)									
Тилозин	916,6	772,5/174	14,9	70	39/49	+2/-50	4,54/4,43	0,74	0,5
Кларитромицин	748,6	158/590,3	16,0	70	33/25	+30/-61	0,22/0,23	0,32	0,5
Тилвалозин	1042,6	229,0/174,0	16,5	70	50/47	+38/-66	3,31/3,46	0,63	0,5
Рокситромицин-D7	844,7	686,4	16,0	70	31/20	+15/-45			
Плевромутилины (Валнемулин-D6)									
Линкомицин	407,3	359,2/126	9,61	70	25/35	-39/-67	0,51/0,49	0,50	0,5
Клиндамицин	425,3	377,1/126	13,5	70	25/35	-21/-66	1,27/1,47	1,32	0,5
Пирлимидин	411,3	112,0/363,0	12,3	70	31/21	-19/-58	2,49/2,48	2,43	0,5
Клиндамицин-D3	428,4	380,0	13,5	70	26/26	-21/-66			
β-агонисты (Кленбутерол-D9)									
Циматерол	220,2	202,2/160,2	7,69	90	14/23	+8/+23	0,74/0,84	1,41	5,0
Циматерол-D7	227,4	209,4	7,7	90	16/9	+8/+23			
Цимбутерол	234,1	216,1/160,1	15,3	90	14/23	-10/-78	0,17/0,20	0,42	1,0
Ритодрин	288,1	121,1/270	9,2	90	31/19	-23/-60	1,29/1,21	0,23	1,0
Фенотерол	304,2	107,1/135,1	9,0	90	43/26	-34/-76	1,79/1,63	0,43	5,0
Цимбутерол-D9	243,4	161,4	15,3	90	21/9	-10/-78			
Кленбутерол	277	258,9/203,1	11,0	90	16/24	-25/-37	2,05/2,11	1,95	1,0
Гидроксиметил-кленбутерол	293,2	274,9/203,1	10,0	90	18/26	-20/-66	1,68/1,50	1,56	1,0
Кленбутерол-D9	286,1	268,0	11,0	90	17/9	-25/-37			
Салбутамола	240,1	222,1/148,3	8,0	90	16/26	-3/-13	2,43/2,32	0,54	5,0
Зилпатерол	262,2	244,1/185	13,9	90	17/33	-6/-71	1,05/1,08	0,75	1,0
Бромбутерол	367,1	349,1/292,8	11,7	90	18/24	-5/-75	1,92/1,94	0,84	1,0
Мабутерол	311,2	292,9/237	11,8	90	17/24	-7/-63	1,67/1,63	0,63	0,5
Тулобутерол	228,1	154,1/119,1	11,6	90	22/42	-3/-16	1,29/1,30	0,73	1,0
Тербуталин	226,3	152,3/125,3	7,85	90	27/33	-8/-68	4,46/4,47	0,44	1,0
Мабутерол-D9	320,2	238,2	11,8	90	26/9	-7/-63			
Мапентерол	325,1	237,1/217	12,7	90	22/34	-12/-68	0,31/0,38	0,93	0,5

Аналит	Ион-предшественник, <i>m/z</i>	Дочерние ионы, <i>m/z</i>	Время удерживания, <i>t_R</i> , мин	Потенциал декарбонизации, В	Энергия столкновений, эВ	МЭ, % мин/макс	<i>k</i> вода/матрица (среднее значение)	<i>k</i> ₁ (среднее значение)	<i>c</i> _{мин} , мкг/кг
Кленпентерол	290,9	203,1/273	12,0	90	23/15	-14/-72	0,66/0,73	0,56	0,5
Изоксуприн	302,1	284,1/150,1	11,9	90	20/31	-14/-71	0,67/0,63	0,53	1,0
Мапентерол-D11	336,2	238,2	12,7	90	25/9	-12/-68			
Рактопамин	302,2	284,1/121,1	11,5	90	16/21	-5/-68	0,41/0,49	0,50	1,0
Кленпроперол	263,0	245/203,2	15,6	90	16/27	-8/-72	0,66/0,62	0,60	1,0
Рактопамин-D6	308,1	290,1	11,5	90	17/10	-5/-68			
Хинолоны (Энрофлоксацин-D5)									
Ципрофлоксацин	332,0	231/288,1	10,7	50	49/25	-16/-61	1,18/1,09	1,10	0,5
Ципрофлоксацин-D8	340,0	296,1	10,7	50	27/18	-16/-61			
Данофлоксацин	358,1	314,0/96,0	11,1	50	26/31	-5/-63	1,64/1,65	0,75	0,1
Дифлоксацин	400,2	356,0/299,0	11,1	50	29/40	-45/-78	1,85/1,79	1,44	0,1
Дифлоксацин-D3	403,2	299,1	11,1	50	42/9	-45/-78			
Энрофлоксацин	360,2	316,1/245,1	10,9	150	26/35	-25/-66	0,84/0,73	0,80	0,1
Офлоксацин	362,1	261/318,1	10,4	50	25/38	-38/-81	1,19/1,17	1,15	0,1
Ломефлоксацин	352,2	265,1/308,1	11,0	50	32/24	-13/-70	0,65/0,64	0,64	0,1
Энрофлоксацин-D5	365,2	321,2	10,9	150	28/9	-20/-60			
Налидиксовая кислота	233,1	187,0/215,0	15,3	50	35/21	-6/-72	1,00/1,10	1,10	1,0
Налидиксовая кислота-D5	238,1	192,1	15,3	50	35/15	-6/-70			
Норфлоксацин	320,1	276,3/302,3	10,6	150	23/27	-10/-54	1,85/1,89	1,00	0,1
Флюмеквин	262,1	202,0/244,0	15,6	50	42/22	-31/-81	0,45/0,54	0,84	1,0
Марбофлоксацин	363,0	345,1/320,1	10,0	50	33/20	-6/-67	1,50/1,66	0,53	0,1
Норфлоксацин-D5	325,2	307,1	10,6	180	31/9	-5/-53			
Оксилиновая кислота	262,1	216,1/244	13,9	50	35/24	-15/-80	1,33/1,21	1,83	1,0
Пипемидовая кислота	304,2	286,1/217	9,76	50	26/30	-3/-74	1,95/1,89	1,23	0,5
Оксилиновая кислота-D5	267,1	249,0	13,9	50	30/20	-10/-78			
Сарафлоксацин	386,2	342,1/299,1	11,3	50	26/38	-71/-82	0,46/0,51	2,23	0,5
Сарафлоксацин-D8	394,2	350,2	11,3	50	30/16	-71/-82			
Амфениколы (Хлорамфеникол-D5)									
Флорфеникол (-)	356,0	185,1/119,1	11,8	-70	26/45	-9/-29	0,59/0,53	0,56	1,0
Хлорамфеникол (-)	321,0	152,0/257,0	13,4	-60	24/16	-15/-42	0,95/0,93	0,94	0,2
Хлорамфеникол-D5 (-)	326,0	157,0	13,4	-60	25	-10/-39			

Таблица 3. Результаты анализа пищевых продуктов по разработанной методике и ГОСТ ($n = 3$; $P = 0,95$)**Table 3.** Results of the food analysis according to the developed methodology and GOST ($n = 3$; $P = 0.95$)

Объект анализа	Аналит	Найдено, мкг/кг (S_r)	
		Разработанная методика	ГОСТ
Мясо цыпленка бройлера	Ципрофлоксацин	43 ± 5 (0,05)	49 ± 3 (0,02)
Мясо курицы	Хлорамфеникол	$8,2 \pm 0,9$ (0,04)	$6,1 \pm 0,4$ (0,03)
Колбаса	Окситетрациклин	18 ± 4 (0,09)	12 ± 6 (0,20)
	Доксициклин	$8,0 \pm 0,3$ (0,02)	$8,0 \pm 0,9$ (0,05)
Говядина	Хлорамфеникол	20 ± 6 (0,12)	17 ± 4 (0,09)
Яйцо	Ципрофлоксацин	18 ± 2 (0,04)	16 ± 5 (0,13)
Рыба	Энрофлоксацин	84 ± 7 (0,03)	90 ± 6 (0,03)
	Ципрофлоксацин	$5,4 \pm 0,6$ (0,04)	$4,1 \pm 0,8$ (0,08)

венно сокращаются продолжительность и стоимость анализа.

Заключение

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией позволяет максимально эффективно решать повседневные лабораторные задачи, такие как скрининг проб и определение остаточных содержаний ветеринарных препаратов и их метаболитов в случае установления соответствия продукции регламентируемым требованиям. В работе рассмотрены упрощенная пробоподготовка и способ изотопного разбавления для определения концентрации 80 аналитов. Исключены стадии твердофазной экстракции, матричной градуировки. Предложено для каждого класса соединений использовать один изотопно-меченый стандарт. Установлено, что поправочный коэффициент не меняется при использовании водных растворов аналитов и аналитов, извлеченных из различных матриц. Для определения концентрации в пробу вводили изотопно-меченые стандарты (по одному из каждого класса), проводили пробоподготовку и хроматографирование, в случае обнаружения какого-либо лекарственного средства концентриру рассчитывали с учетом поправочного коэффициента.

Финансирование

Работа выполнена на базе отдела безопасности пищевой и кормовой продукции ФГБУ «ВГНКИ».

ЛИТЕРАТУРА

1. Regal P., Lamas A., Franco C. M., Cepeda A. Veterinary drugs: Progress in multiresidue technique / Encyclopedia of Food Chemistry // L. Melton, F. Shahidi, P. Varelis, Eds. — Academic Press, 2019. P. 470 – 480. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21809-X

2. Лаврухина О. И., Амелин В. Г., Киш Л. К. и др. Определение остаточных количеств антибиотиков в объектах окружающей среды и пищевых продуктах / Журн. аналит. химии. 2022. Т. 77. № 11. С. 969 – 1015. DOI: 10.31857/S004445022211007X
3. Stickle D. F., Garg U. Validation, quality control, and compliance practice for mass spectrometry assays in the clinical laboratory / Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory // H. Nair, W. Clarke, Ed. — Academic Press, 2017. P. 63 – 76. DOI: 10.1016/B978-0-12-800871-3.00004-3
4. De Oliveira Arias J. L., Schneider A., Batista-Andrade J. A., et al. Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk / Food Chem. 2018. Vol. 240. P. 1243 – 1253. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.041
5. Neely S., Martin J., da Cruz N. F., et al. Application of dispersive solid phase extraction for trace analysis of toxic chemicals in foods / J. Chromatogr. B. 2018. Vol. 1092. P. 65 – 71. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.05.043
6. Al Tamim A., Alzahrani S., Al-Subaie S., et al. Fast simultaneous determination of 23 veterinary drug residues in fish, poultry, and red meat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / Arab. J. Chem. 2022. Vol. 15. N 10. 104116. DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.104116
7. Imamoglu H., Oktem Olgun E. Analysis of Veterinary Drug and Pesticide Residues Using the Ethyl Acetate Multiclass/Multiresidue Method in Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / J. Anal. Methods Chem. 2016. 2170165. DOI: 10.1155/2016/2170165
8. Мелехин А. О., Толмачева В. В., Шубина Е. Г. и др. Применение сверхсшитого полистирола для многокомпонентной твердофазной экстракции остатков 63 ветеринарных препаратов при их определении в курином мясе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии / Журн. аналит. химии. 2021. Т. 76. № 8. С. 708 – 722. DOI: 10.31857/S0044450221060049
9. Wang K., Lin K., Huang X., Chen M. A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS / J. Agric. Food Chem. 2018. Vol. 65 P. 5064 – 5073. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01777
10. Piatkowska M., Gbylik-Sikorska M., Gajda A., et al. Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation / Food Chem. 2017. Vol. 229. P. 646 – 652. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.147
11. Casey C. R., Andersen W. C., Williams N. T., et al. Multiclass, Multiresidue Method for the Quantification and Confirmation of 112 Veterinary Drugs in Game Meat (Bison, Deer, Elk, and Rabbit) by Rapid Polarity Switching Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / J. Agric. Food Chem. 2021. Vol. 69. N 4. P. 1175 – 1186. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c01422

12. **Chen D., Yu J., Tao Y., et al.** Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / *J. Chromatogr. B*. 2016. Vol. 1017 – 1018. P. 82 – 88. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.02.037
13. **Dasenaki M. E., Thomaidis N. S.** Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / *Anal. Chim. Acta*. 2015. Vol. 880. P. 103 – 121. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.013
14. **Melekhin A. O., Tolmacheva V. V., Goncharov N. O., et al.** Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hypercrosslinked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography — tandem mass spectrometry / *Food Chem.* 2022. Vol. 387. 132866. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132866
15. ГОСТ 34533–2019. Межгосударственный стандарт. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. — М.: Стандартинформ, 2019. — 17 с.
16. ГОСТ 31694–2012. Межгосударственный стандарт. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. — М.: Стандартинформ, 2013. — 20 с.
17. ГОСТ 34136–2017. Межгосударственный стандарт. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания макролидов, линкозамидов и плевромутилинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. — М.: Стандартинформ, 2018. — 13 с.
18. ГОСТ 33486–2015. Межгосударственный стандарт. Продукты пищевые, комбикорма, объекты биологического животного происхождения. Метод определения содержания β -адрено-стимуляторов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. — М.: Стандартинформ, 2020. — 19 с.
19. ГОСТ 32797–2014. Межгосударственный стандарт. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. — М.: Стандартинформ, 2015. — 14 с.
6. **Al Tamim A., Alzahrani S., Al-Subaie S., et al.** Fast simultaneous determination of 23 veterinary drug residues in fish, poultry, and red meat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / *Arab. J. Chem.* 2022. Vol. 15. N 10. 104116. DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.104116
7. **Imamoglu H., Oktem Olgun E.** Analysis of Veterinary Drug and Pesticide Residues Using the Ethyl Acetate Multiclass/Multiresidue Method in Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / *J. Anal. Methods Chem.* 2016. 2170165. DOI: 10.1155/2016/2170165
8. **Melekhin A. O., Tolmacheva V. V., Dmitrienko S. G., et al.** Using hypercrosslinked polystyrene for the multicomponent solid-phase extraction of residues of 63 veterinary preparations in their determination in chicken meat by high-performance liquid chromatography — tandem mass spectrometry / *J. Anal. Chem.* 2021. Vol. 76. N 8. P. 946 – 959. DOI: 10.1134/S1061934821060046
9. **Wang K., Lin K., Huang X., Chen M.** A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS / *J. Agric. Food Chem.* 2018. Vol. 65. P. 5064 – 5073. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01777
10. **Piatkowska M., Gbylik-Sikorska M., Gajda A., et al.** Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation / *Food Chem.* 2017. Vol. 229. P. 646 – 652. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.147
11. **Casey C. R., Andersen W. C., Williams N. T., et al.** Multi-class, Multiresidue Method for the Quantification and Confirmation of 112 Veterinary Drugs in Game Meat (Bison, Deer, Elk, and Rabbit) by Rapid Polarity Switching Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry / *J. Agric. Food Chem.* 2021. Vol. 69. N 4. P. 1175 – 1186. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c01422
12. **Chen D., Yu J., Tao Y., et al.** Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / *J. Chromatogr. B*. 2016. Vol. 1017 – 1018. P. 82 – 88. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.02.037
13. **Dasenaki M. E., Thomaidis N. S.** Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / *Anal. Chim. Acta*. 2015. Vol. 880. P. 103 – 121. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.013
14. **Melekhin A. O., Tolmacheva V. V., Goncharov N. O., et al.** Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hypercrosslinked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography — tandem mass spectrometry / *Food Chem.* 2022. Vol. 387. 132866. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132866
15. GOST 34533–2019. Interstate standard. Food products, food raw materials. Method for determination of sulfonamides, nitroimidazoles, penicillins, amphenicols by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. — Moscow: Standartinform, 2019. — 17 p. [in Russian].
16. GOST 31694–2012. Interstate standard. Food products, food raw materials. Method of determination of the antibiotic residues of tetracycline group by High Performance Liquid Chromatography — Mass Spectrometry. — Moscow: Standartinform, 2013. — 20 p. [in Russian].
17. GOST 34136–2017. Interstate standard. Food products, food raw materials. Method for determination of the residual content of macrolides, lincosamides and pleuromutilins by high performance liquid chromatography — mass spectrometry. — Moscow: Standartinform, 2018. — 13 p. [in Russian].
18. GOST 33486–2015. Interstate standard. Food products, mixed feeds, biological objects of animal origin. Method for determination of β -agonists by high performance liquid chromatography — mass spectrometry. — Moscow: Standartinform, 2020. — 19 p. [in Russian].
19. GOST 32797–2014. Interstate standard. Food products, food raw materials. Method for determination of the chynolony content by high performance liquid chromatography with mass spectrometry detector. Moscow: Standartinform, 2015. — 14 p. [in Russian].

REFERENCES

1. **Regal P., Lamas A., Franco C. M., Cepeda A.** Veterinary drugs: Progress in multiresidue technique / *Encyclopedia of Food Chemistry* // L. Melton, F. Shahidi, P. Varelis, Eds. — Academic Press, 2019. P. 470 – 480. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21809-X
2. **Lavrukhina O. I., Amelin V. G., Kish L. K., et al.** Determination of Residual Amounts of Antibiotics in Environmental Samples and Food Products / *J. Anal. Chem.* 2022. Vol. 77. N 11. P. 1399 – 1412. DOI: 10.1134/S1061934822110077
3. **Stickle D. F., Garg U.** Validation, quality control, and compliance practice for mass spectrometry assays in the clinical laboratory / *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* // H. Nair, W. Clarke, Ed. — Academic Press, 2017. P. 63 – 76. DOI: 10.1016/B978-0-12-800871-3.00004-3
4. **De Oliveira Arias J. L., Schneider A., Batista-Andrade J. A., et al.** Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk / *Food Chem.* 2018. Vol. 240. P. 1243 – 1253. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.041
5. **Neely S., Martin J., da Cruz N. F., et al.** Application of dispersive solid phase extraction for trace analysis of toxic chemicals in foods / *J. Chromatogr. B*. 2018. Vol. 1092. P. 65 – 71. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.05.043