



УДК 641:615.33.001.891

ПРОБОПОДГОТОВКА QuEChERS ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ ХИНОЛОНОВОГО РЯДА И ХЛОРАМФИНЕКОЛА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ-ДМД



Н. М. Волкова¹, В. Г. Амелин², А. В. Третьяков¹,
О. И. Абраменкова¹, А. А. Тимофеев¹

¹ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»,
Владимир, мкр. Юрвец

²Владимирский государственный университет
E-mail: amelinvg@mail.ru

Предложен способ одновременного определения 6 антибиотиков хинолонового ряда и хлорамфеникола в пищевых продуктах методом ВЭЖХ с диодноматричным детектированием: энрофлоксацина, данофлоксацина, ломефлоксацина, энрофлоксацина, дифлоксацина, оксолиновой кислоты и хлорамфеникола с использованием упрощенной, быстрой и безопасной пробоподготовки QuEChERS. Пределы обнаружения антибиотиков при массе навески 5 г составили 0,002–0,04 мг/кг. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,09. Продолжительность анализа составляет около 1 ч.

Ключевые слова: антибиотики хинолонового ряда, хлорамфеникол пищевые продукты, ВЭЖХ-ДМД.

QuEChERS Sample Preparation in Simultaneous Determination of Residual Amounts of Antibiotics Quinolone Series and Chloramphenicol in Food by HPLC-DAD

N. M. Volkova, V. G. Amelin A. V. Tretyakov,
O. I. Abramenkova, A. A. Timofeev

A new method has been developed which allows for the simultaneous determination of six quinolone and chloramphenicol antibiotics residues in food by HPLC (High-performance liquid chromatography) with diode-array detection of enoxacin, danofloxacin, lomefloxacin, enrofloxacin, oxolinic acid, difloxacin and chloramphenicol. The samples were prepared using simplified, quick and safe sample preparation QuEChERS. The detection limits of quinolones and chloramphenicol with sample weight of 5 g were 0,002–0,04 mg/kg. The relative standard deviations analysis results is less than 0,09. The analysis time is about 1 hour.

Key words: antibiotics quinolone series, chloramphenicol, food, HPLC-DAD.

Антибиотики хинолонового ряда – энноксацин (ЭНО), данофлоксацин (ДАНО), ломефлоксацин (ЛОМЕ), энрофлоксацин (ЭНРО), дифлоксацин (ДИ), оксолиновая кислота (ОКС) и хлорамфеникол (ХЛФ) часто используются в ветеринарии и животноводстве, поэтому остаточные их количества могут встречаться в пищевых продуктах животного происхождения [1]. Употребление в

пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, негативно сказывается на организме человека, в связи с этим их содержание нормируется. Согласно Приложению № 21 к СанПиН 2.3.2.1078-01 максимально допустимые уровни остатков фторхинолонов в пищевых продуктах (молоко, печень, почки) не должны превышать 0,1–0,3 мг/кг, дифлоксацина 0,4 мг/кг в мясе и 0,1 мг/кг в жире, данофлоксацина 0,03; 0,1; 0,05 мг/кг в молоке, мясе и жире соответственно, оксолиновой кислоты – 0,1 мг/кг в мясе и 0,05 мг/кг в жире, хлорамфеникола (ХЛФ) – 0,01 мг/кг во всех продуктах животного происхождения. В РФ отсутствуют нормативные документы по одновременному количественному определению остатков хинолонов и хлорамфеникола в пищевых продуктах.

Предложен способ определения пяти хинолонов (марбофлоксацина, дифлоксацина, норфлоксацина, энрофлоксацина и ципрофлоксацина) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектором (ВЭЖХ-ДМД) в мясе и яйцах. Извлечение антибиотиков из проб проводили ацетонитрилом, очистку экстракта и концентрирование – с использованием твердофазной экстракции [2]. Предложено также определение 13 хинолонов в кормах методом ВЭЖХ с ДМД и флуориметрическим детектором и пробоподготовкой с использованием твердофазной экстракции [3]. Однако данные способы длительны и требуют использования достаточно больших количеств токсичных органических растворителей для извлечения и концентрирования хинолонов.

Предложены способы определения ХЛФ в продуктах питания, в том числе животного происхождения, методами ВЭЖХ [4], ЖХ-МС/МС, ГХ-МС [5] с применением трудоёмкой и длитель-



ной жидкостно-жидкостной экстракции, а также ЖХ-МС с пробоподготовкой QuEChERS [6]. Однако данные методики не экспрессны и подходят для определения только одного антибиотика.

В данной работе предложен быстрый, безопасный и простой способ одновременного извлечения шести хинолонов, хлорамфеникола и их определения в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-ДМД.

Материалы и методы

Аппаратура. В работе использовали жидкостной хроматограф с диодноматричным детектором Flexar DAD (Perkin-Elmer, США). Разделение проводили на колонке (150×3,9 мм) XTerra™ RP₁₈ (3 мкм) (Waters, США) в режиме градиентного элюирования подвижной фазы.

Реактивы. Использовали стандартные образцы антибиотиков: энноксацин, ломефлоксацин, энрофлоксацин (Sigma, Китай), данофлоксацин, оксолиновая кислота (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия), дифлоксацин (Fluka, Германия), хлорамфеникол (Sigma, Германия). Стандартные растворы с концентрацией 10 мкг/мл готовили в ацетонитриле. Использовали ацетонитрил для хроматографии (Merck, Германия), сульфат магния, х.ч., хлорид натрия, х.ч., натрий лимоннокислый тризамещенный двойной гидрат, х.ч., натрий лимоннокислый двузамещенный полуторный гидрат, х.ч., сорбенты Bondesil-PSA (Varian, США) и C18 (Supelco, США), 1-гептасульфоновой кислоты натриевую соль (Dudley Chemical, Россия), калия дигидрофосфат (Merck, Германия).

Пробоподготовка. Пробоподготовку осуществляли по методу QuEChERS [7]. Исследуемые пробы измельчали с помощью миксера. В центрифужную пробирку емкостью 50 мл вносили навеску 5,0 г, добавляли 10 мл ацетонитрила, 0,1 мл конц. муравьиной кислоты, закрывали пробирку и энергично взбалтывали в течение одной минуты. Затем вносили смесь 4,0 г безводного сульфата магния, 1,0 г хлорида натрия, 1,0 г натрия лимоннокислого тризамещенного двойного гидрата и 0,5 г натрия лимоннокислого двузамещенного полуторного гидрата. После внесения солей взбалтывали в течение одной минуты (во избежание образования комков) и центрифугировали в течение 5 мин при 4500 об/мин, отбирали 5 мл верхней части экстракта и переносили в центрифужную пробирку емкостью 15 мл, которая содержала смесь сорбента Bondesil-PSA (0,15 г), C18 (0,15 г) и

сульфата магния (0,9 г). Пробирку энергично встряхивали в течение одной минуты и центрифугировали 5 мин при 2700 об/мин, отбирали 1 мл экстракта в микрофлакон, упаривали в токе азота досуха, остаток растворяли в 100 мкл подвижной фазы и хроматографировали.

Для характеристики эффективности пробоподготовки использовали степень извлечения:

$$R = \frac{c_k}{c_0} \cdot 100,$$

где c_k и c_0 – концентрация аналита, полученная в ходе анализа и начальная концентрация аналита, введенная в пробу.

Результаты и их обсуждение

Фторхинолоны, хинолоны и хлорамфеникол обладают кислотным характером, поэтому в подвижную фазу вводили фосфорную кислоту и разделение проводили в присутствии мицелл гептасульфоната натрия. Варьировали содержание кислоты в подвижной фазе, концентрацию ПАВ и создавали градиент для лучшего разделения хинолонов и ХЛФ. На рис. 1 представлена хроматограмма смеси 6 хинолонов и ХЛФ, полученная в оптимальных условиях: $t = 35^\circ\text{C}$; градиент: фосфатный буфер (20мМ дигидрофосфат калия, 1,2 г/л 1-гептасульфонат натрия, фосфорная кислота до pH=2.2) – ацетонитрил (об. %): 20 (0–3 мин), 17 (3–7 мин), 40 (7–10 мин) и 20 (10–15 мин). Расход подвижной фазы 1,0 мл/мин, длина волны детектирования 280 нм, объем вводимой пробы 10 мкл.

В настоящее время для быстрого извлечения пестицидов и очистки экстрактов применяют способ дисперсионной твердофазной экстракции **QuEChERS** (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe – быстрый, простой, дешевый, эффективный, точный и надежный) [7]. Экстракцию целевых компонентов проводят ацетонитрилом в присутствии буферирующих солей. Очистку экстрактов от липидов, жиров и белков осуществляют насыпными сорбентами Bondesil-PSA, C₁₈, графитированной сажей, ионообменными смолами и их комбинациями.

В данной работе мы применили этот прием для извлечения остаточных количеств антибиотиков из пищевых продуктов и очистки их экстрактов. Выбор соотношения сульфата магния, адсорбентов Bondesil-PSA и C18 осуществляли по максимальным значениям степеней извлечения хинолонов и ХЛФ из реальных объектов, и они составили на 5 г пробы: сульфата магния – 0,9 г, Bondesil-PSA и C18 по 0,15 г.

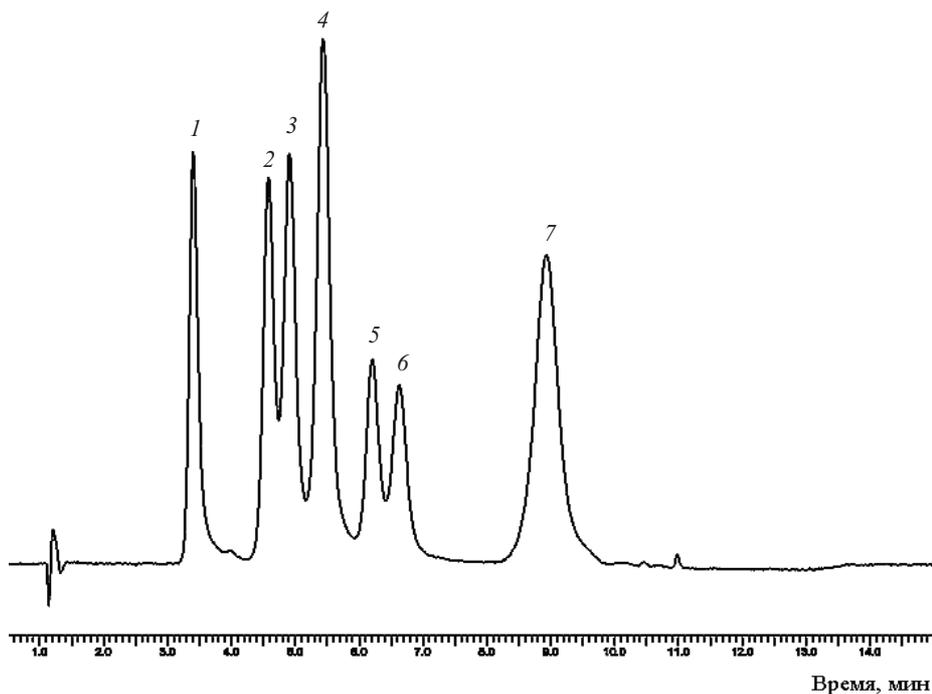


Рис. 1. Хроматограмма смеси растворов антибиотиков (по 10 мкг/мл): 1 – ЭНО, 2 – ДАНО, 3 – ЛОМЕ, 4 – ЭНРО, 5 – ОКС, 6 – ХЛФ, 7 – ДИ

В табл. 1 показаны степени извлечения антибиотиков из различных матриц при использовании QuEChERS в оптимальных условиях. Степень извлечения в зависимости от матрицы колеблется от 62 до 100 %.

Установлено, что на хроматографические пики хинолонов и ХЛФ (в выбранных условиях пробоподготовки и очистки экстракта) не влияют компоненты матриц пищевых продуктов и кормов (белки, жиры, липиды и пр.) (рис. 2).

Таблица 1

Степени извлечения антибиотиков, % (в скобках указано относительное стандартное отклонение – s_r) из различных матриц при использовании пробоподготовки QuEChERS ($n = 3, P = 95$)

Матрица	ЭНО	ДАНО	ЛОМЕ	ЭНРО	ОКС	ДИ	ХЛФ
Мясо курицы	95 ± 1 (0,01)	62 ± 7 (0,12)	73 ± 4 (0,06)	87 ± 6 (0,07)	93 ± 7 (0,08)	96 ± 4 (0,04)	–
Свинина	77 ± 9 (0,12)	53 ± 5 (0,09)	69 ± 6 (0,09)	86 ± 6 (0,07)	96 ± 5 (0,05)	99 ± 2 (0,02)	–
Говядина	91 ± 10 (0,10)	69 ± 5 (0,05)	82 ± 5 (0,06)	95 ± 3 (0,03)	94 ± 5 (0,06)	97 ± 3 (0,03)	–
Сыр	93 ± 2 (0,02)	71 ± 5 (0,05)	85 ± 6 (0,07)	85 ± 3 (0,04)	69 ± 1 (0,02)	99 ± 1 (0,01)	–
Ветчина	68 ± 4 (0,05)	77 ± 2 (0,03)	69 ± 1 (0,02)	95 ± 5 (0,05)	70 ± 7 (0,10)	99 ± 1 (0,01)	–
Печень говяжья	72 ± 2 (0,03)	65 ± 5 (0,08)	65 ± 4 (0,06)	86 ± 2 (0,02)	64 ± 4 (0,06)	100 ± 0,7 (0,01)	–
Молоко	85 ± 3 (0,04)	98 ± 3 (0,04)	83 ± 3 (0,04)	93 ± 2 (0,03)	68 ± 3 (0,05)	100 ± 0,7 (0,01)	–
Мед	99 ± 1 (0,01)	65 ± 5 (0,08)	83 ± 5 (0,06)	99 ± 4 (0,04)	75 ± 3 (0,04)	99 ± 1 (0,01)	–
Яйца	91 ± 1 (0,01)	76 ± 2 (0,03)	85 ± 1 (0,01)	96 ± 5 (0,06)	96 ± 7 (0,07)	99 ± 1 (0,01)	62 ± 5 (0,06)

Примечание. « – » Не исследовалось.

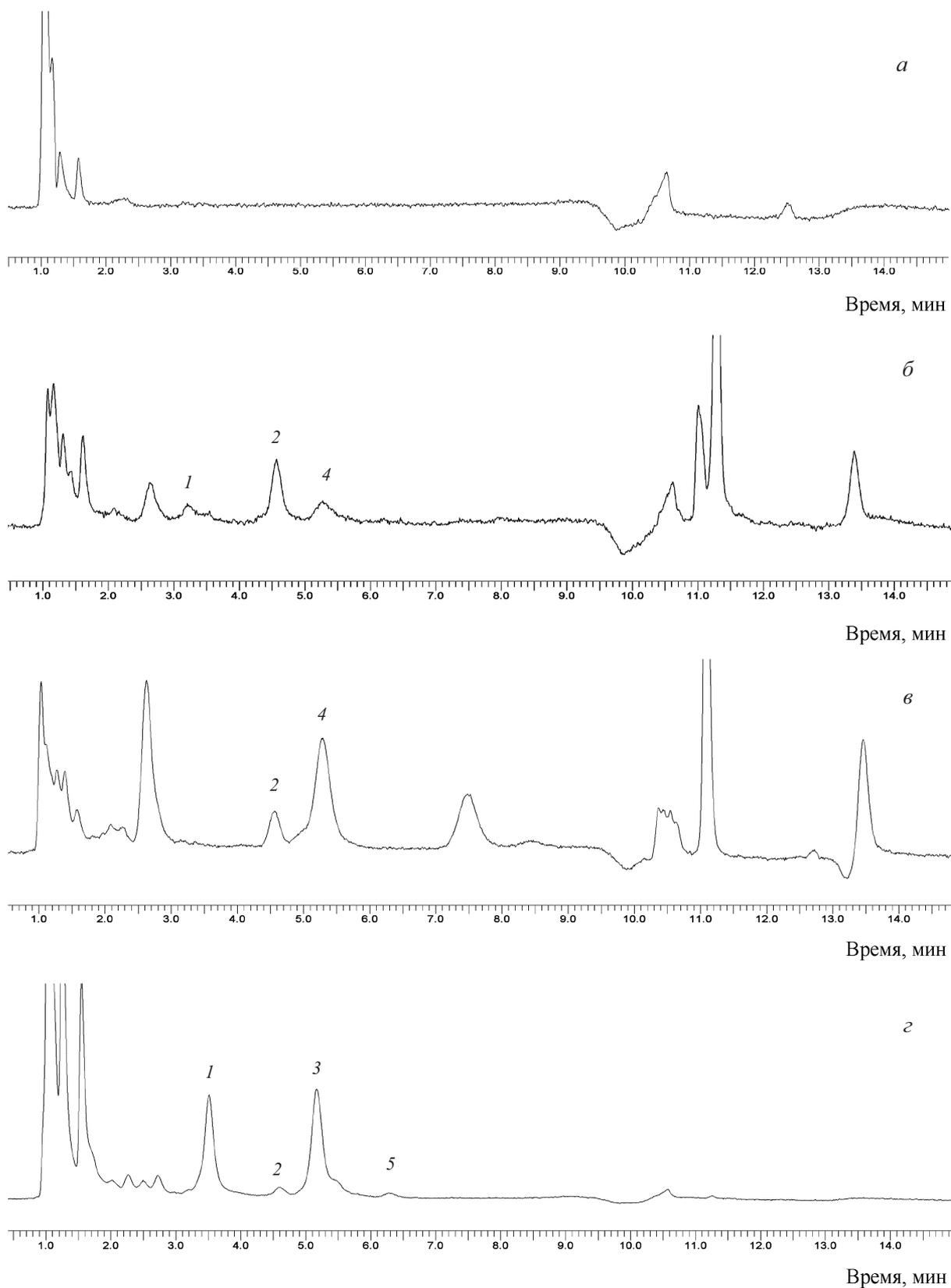


Рис. 2. Хроматограммы экстрактов проб: *a* – говядина, *б* – корм для рыб, *в* – пельмени, *г* – сельдь; 1 – ЭНО, 2 – ДАНО, 3 – ЛОМЕ, 4 – ЭНРО, 5 – ОКС



В табл. 2 представлены аналитические характеристики методики определения хинолонов и ХЛФ. Градуировочные характеристики линейны в диапазоне 0,05–10 мкг/мл ($R^2 \geq 0,99$) для каждого антибиотика. Пределы обнаружения (ПО) расчи-

таны при отношении сигнал/шум = 3, а пределы определения (ПКО) – при отношении сигнал/шум = 10. Пределы определения антибиотиков в пробах с учетом навески и концентрирования экстракта варьируются от 0,008 до 0,12 мг/кг.

Таблица 2

Аналитические характеристики методики определения фторхинолонов, оксолиновой кислоты и ХЛФ при диапазоне линейности градуировочной характеристики 0,05–10 мкг/мл ($n = 3, P = 0,95$)

Антибиотик	t_R , мин	Уравнение градуировочной характеристики	R^2	ПО, мкг/мл	ПКО, мкг/мл	ПО при навеске 5 г, мг/кг	ПКО при навеске 5 г, мг/кг
ЭНО	3,38	$y = -5992+40106x$	0,9928	0,02	0,05	0,004	0,01
ДАНО	4,53	$y = -1357+42621x$	0,9904	0,01	0,04	0,002	0,008
ЛОМЕ	4,87	$y = -9619+60674x$	0,9983	0,04	0,1	0,008	0,02
ЭНРО	5,37	$y = -15848+89105x$	0,9974	0,01	0,04	0,002	0,008
ОКС	6,26	$y = -6780+32167x$	0,9946	0,2	0,5	0,04	0,10
ХЛФ	6,65	$y = -5992+40105x$	0,9928	0,1	0,5	0,02	0,1
ДИ	8,86	$y = -24759+66095x$	0,9915	0,2	0,6	0,04	0,12

Результаты анализа продуктов питания и кормов показывают достаточно высокую точность разработанной методики, относительное стандартное отклонение результатов анализа не

превышает 0,09 (см. табл. 1, 3). В большинстве проанализированных продуктов установлено превышение остаточных количеств фторхинолонов.

Таблица 3

Результаты определения антибиотиков, мг/кг (в скобках указано относительное стандартное отклонение – s_r) в некоторых реальных объектах ($n = 3, P = 95$)

Матрица	ЭНО	ДАНО	ЛОМЕ	ЭНРО	ОКС	ХЛФ	ДИ
Мясо курицы	–*	–	–	0,018±0,005 (0,08)	–	–	–
Свинина	–	–	–	–	–	–	–
Молоко	–	0,044±0,003 (0,09)	–	–	–	–	–
Корм для рыб	0,13±0,02 (0,06)	0,19±0,03 (0,05)	–	0,12±0,03 (0,07)	–	–	–
Сельдь копченая	1,84±0,07 (0,08)	0,14±0,01 (0,07)	1,44±0,06 (0,09)	–	0,21±0,04 (0,08)	–	–
Говядина	–	–	–	–	–	–	–
Пельмени	–	0,22±0,03 (0,07)	–	0,51±0,04 (0,04)	–	–	–
Яйца	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. * – Не обнаружено.

Разработана методика одновременного определения шести хинолонов и ХЛФ в пищевых продуктах методом ВЭЖХ-ДМД. Предложено использовать для извлечения антибиотиков из

пищевых продуктов быстрый и безопасный прием пробоподготовки QuEChERS. Показана эффективность анализа реальных объектов с применением предлагаемой методики.



Список литературы

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. М.: Новая волна. 2005. С. 842–850.
2. Gigoso P. G., Revesado P. R., Cadahia O. et al. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection // J. Chromatogr. A. 2000. Vol. 871. P. 31–36.
3. Pecorelli I., Galarini R., Bibi R. et al. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography // Anal. Chim. Acta. 2003. Vol. 483. P. 81–89.
4. Juan Han, Yun Wang, Cui-Lan Yu et al. Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography // Anal. Bioanal. Chem. 2011. Vol. 399. P. 1295–1304.
5. Gantverg A., Shishani I., Hoffman M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2003. Vol. 483. P. 125–135.
6. Pan C., Zhang H., Chen S. et al. Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography-mass spectrometry after use QuEChERS clean-up // Acta Chromatogr. 2006. № 17. P. 320–327.
7. Anastassiades M., Lehoutay S. J., Stajnbaher D., Schenck F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce // J. AOAC Inter. 2003. Vol. 86, № 2. P. 412–431.

УДК 542.87

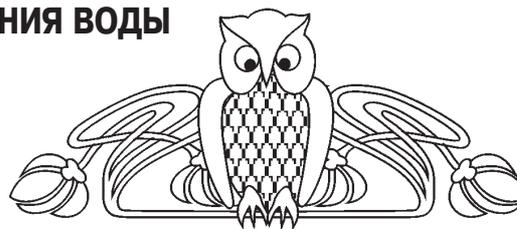
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАРАЖЕНИЯ ВОДЫ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

А. В. Голец¹, Е. В. Скиданов¹, И. А. Казаринов²

¹ООО НПП «ЛИССКОН», Саратов

²Саратовский государственный университет

E-mail: ag707@inbox.ru



Целью настоящей работы являлось установление корреляции между количеством бактерий в инфицированных водных средах и концентрацией иодид-ионов, образующихся в воде, обеззараженной при помощи бактерицида на основе четвертичных аммониевых оснований, насыщенных иодом.

Показана возможность применения таких бактерицидов для экспресс-определения (не более 5 мин) бактериального заражения воды методом прямой потенциометрии с использованием иодид-селективного электрода.

Разработана методика определения бактериального заражения воды с помощью бактерицидного датчика и потенциометрической ячейки. Установлена количественная зависимость потенциала иодид-селективного электрода от концентрации бактерий *Escherichia coli* в водных средах в стационарной и проточной ячейках.

Ключевые слова: потенциометрия, иодид-селективный электрод, бактерицид, бактерии *Escherichia coli*.

Potentiometric Analysis of Bacterial Water Contamination

A. V. Golets, E. V. Skidanov, I. A. Kazarinov

The purpose of the present work was to find a correlation between the quantity of bacteria in infected aqueous media and the concentration of iodide ions formed in water disinfected by means of a bactericide on the basis of iodine-saturated quaternary ammonium bases.

The possibility of application of such bactericides for rapid analysis (no longer than 5 min) of bacterial water contamination by direct potentiometry with the usage of an iodide-selective electrode is shown. An analysis technique for bacterial water contamination by means of a bactericidal sensor and a potentiometric cell has been developed. A quantitative dependence of the iodide-selective electrode potential on the *Escherichia coli* bacteria concentration in aqueous media in stationary and flowing cells has been established.

Key words: potentiometry, iodide-selective electrode, bactericide, *Escherichia coli* bacteria.

Одной из главных проблем современной цивилизации является ограниченный ресурс питьевой воды. Многие открытые водоемы с питьевой водой, как правило, подвергнуты или могут быть подвергнуты бактериальному заражению. В связи с этим существует проблема создания эффективных бактерицидных средств, применяемых для дезинфекции питьевой воды и различных водных растворов. В настоящее время общепринятыми для обеззараживания водных растворов являются способы, связанные с добавлением в зараженную среду свободных окислителей, например Cl₂, Br₂, I₂, O₃, и др. [1, 2]. Обеззараживающее воздействие при этом достигается прямым окислением