

## Детектирование ветеринарных препаратов в свинине и молоке

Использование трехквадрупольного масс-спектрометра Ultivo со стандартным источником ионизации электрораспылением



Рис. 1. Agilent Ultivo LC/TQ с источником ионизации электрораспылением

### Автор

Тереза Сосински  
(Theresa Sosienski),  
Agilent Technologies, Inc.

### Аннотация

В настоящих рекомендациях по применению освещается 10-минутный аналитический метод точного количественного анализа 12 регламентируемых соединений ветеринарных препаратов в свинине и молоке. В данном методе используется система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Prime и трехквадрупольный масс-спектрометр Agilent Ultivo с источником ионизации электрораспылением. Двенадцать соединений ветеринарных препаратов, выбранных для оценки в этом методе, имеют максимальные остаточные уровни (MRL) до 1 000 мкг/кг согласно мировым нормативным требованиям и требуют выполнения анализа на уровнях, превышающих MRL в 5 раз. Понятная конструкция и простое техническое обслуживание Ultivo делает систему хорошо подходящей для детектирования этих ветеринарных препаратов с высокой пропускной способностью. Свиной фарш и молоко были выбраны в качестве широкого состава матриц с высоким содержанием жира и воды. Этот метод превосходит по требованиям к чувствительности мировые нормативы и отличается высокой производительностью (ОСО < 14%) для всех соединений ветеринарных препаратов, включенных в этот метод.

## Введение

Ветеринарные препараты преимущественно применяются для предотвращения заражения домашнего скота болезнями и паразитами, а также для стимуляции роста. Неправильное использование ветеринарных препаратов в животноводческом хозяйстве может привести к накоплению этих препаратов в тканях животных и других продуктах животного происхождения, например в молоке и яйцах. Из-за мировых проблем присутствия ветеринарных препаратов в продовольственных продуктах животноводства рабочая группа Американской ассоциации официальных химиков-аналитиков недавно предложила требования к характеристикам стандартных методов (SMPR) для обширного списка соединений ветеринарных препаратов. К ним относятся пределы обнаружения на основе нормативов США<sup>1</sup>, Кодекса ЕС<sup>2</sup>, Китая<sup>3</sup> и Канады<sup>4</sup> в отношении остаточных количеств ветеринарных препаратов в мясе и молоке. Было предложено в качестве требования к пределу обнаружения установить половину MRL, при этом в качестве значения по умолчанию всегда выбирается минимальное значение MRL среди регулирующих органов.

Двенадцать ветеринарных препаратов, включенных в этот метод, представляют собой группу ветеринарных препаратов, имеющих относительно высокие значения MRL в молоке и мясе. Каждое из соединений ветеринарных препаратов имеет целевой уровень тестирования, заданный как 1/2 MRL соединения. Целевые уровни тестирования 12 исследуемых соединений варьируются от 22,5 до 100 мкг/кг в молоке и от 50 до 500 мкг/кг в мясе (табл. 1). Трехквadrupольный масс-спектрометр Ultivo со стандартным источником ионизации электроспреем может стать идеальной системой для таких измерений.

Таблица 1. Целевые уровни тестирования 12 ветеринарных препаратов в молоке и мясе

Соединение	Целевой уровень тестирования в молоке (мкг/кг)	Целевой уровень тестирования в мясе (мкг/кг)
Цефтиофур	50	500
Хлортетрациклин	50	50
Клозантел	22,5	500
Дигидрострептомицин	62,5	250
Диминазен	75	250
Фенбендазол	50	50
Линкомицин	75	50
Новобиоцин	25	500
Окситетрациклин	50	50
Спирамицин	100	100
Стрептомицин	62,5	250
Тетрациклин	50	50

Настоящие рекомендации по применению демонстрируют воспроизводимый количественный анализ 12 регламентируемых соединений ветеринарных препаратов в свинине и молоке с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Prime и трехквadrupольного масс-спектрометра Ultivo, оборудованного источником ионизации электроспреем. Система Ultivo с ионизацией электроспреем унаследовала превосходную эффективность линейки Ultivo.

## Экспериментальная часть

### Реагенты и химические вещества

Все использованные реагенты по степени чистоты были предназначены для ВЭЖХ или для ВЭЖХ-МС. Ацетонитрил и метанол были приобретены у компании Honeywell (Morristown, NJ, США), а вода высшей степени очистки была получена с применением интегральной системы Milli-Q, оборудованной фильтром тонкой очистки LC-Pak и мембранным картриджем с размером пор 0,22 мкм (EMD Millipore, Billerica, MA, США). Муравьиная кислота была приобретена в компании Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, США), а фторид аммония (плотный порошок) —

в компании Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, США). Был приготовлен исходный 5 М раствор. Стандарты ветеринарных препаратов также были приобретены в компании Sigma-Aldrich.

### Пробоподготовка

Свежее 2% пастеризованное органическое молоко и не содержащий антибиотиков свиной фарш (80% постного мяса, 20% жира) были куплены в местных продуктовых магазинах. Пробы свинины или молока (2 г) взвешивались в полипропиленовых пробирках на 50 мл и замораживались до анализа. Использовали методику пробоподготовки свинины, ранее обоснованную Чжао и др.<sup>5</sup>. Эта методика также была модифицирована для экстракции молока. Процессы пробоподготовки обобщены на рис. 2. Система Heidolph Hei-MIX Multi Reax использовалась для перемешивания проб вихревым способом. Картриджи Agilent Captiva EMR-Lipid, 6 мл, 600 мг (кат. № 5190-1004) применялись для конечной очистки экстракта свинины. Картриджи Captiva EMR-Lipid обеспечивают эффективное и селективное удаление липидов с превосходным извлечением гидрофобных аналитов.

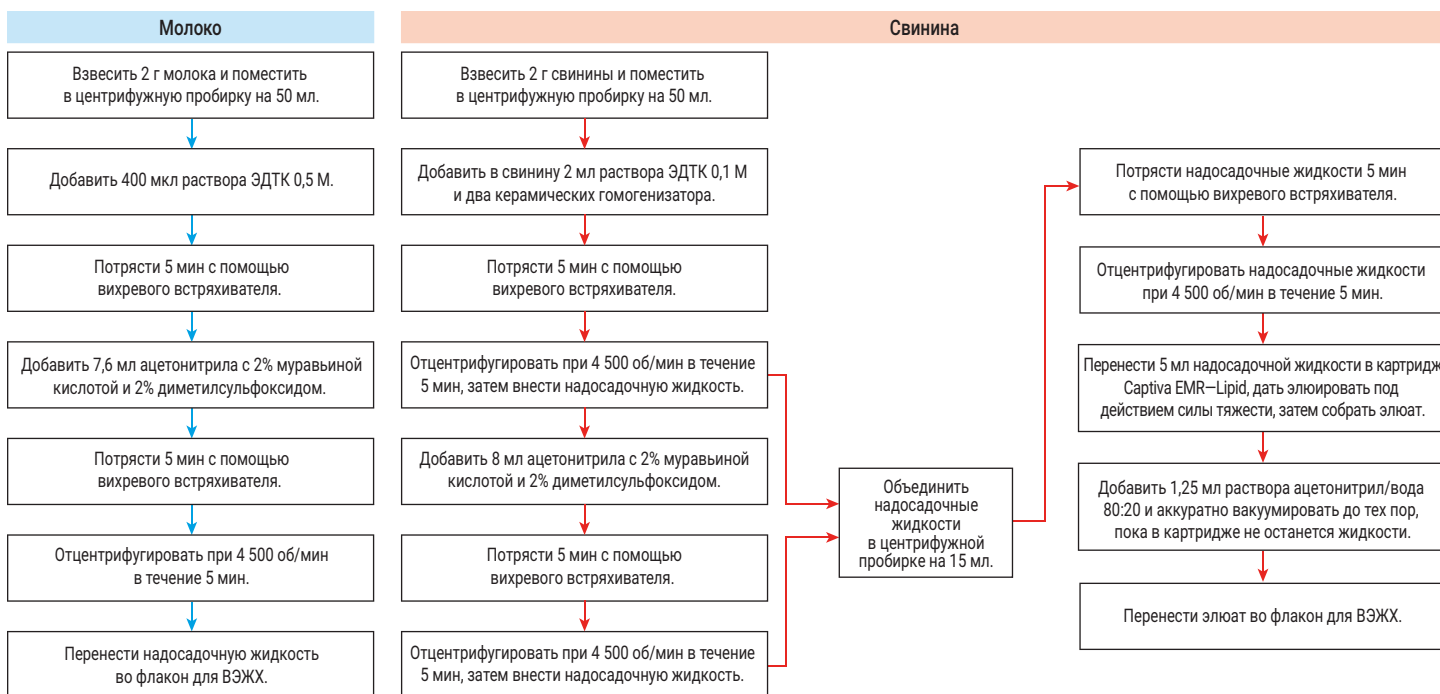


Рис. 2. Процедура пробоподготовки для анализа ветеринарных препаратов в свинине и молоке

## Оборудование

Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Prime

- Универсальный четырехканальный насос 1260 Infinity II Prime Flexible Pump (G7104C)
- Автосамплер Agilent 1260 Infinity II Multisampler с холодильником (G7167A)
- Многоколоночный термостат 1260 Infinity II (G7116A)

Трехкврупольная система ВЭЖХ-МС Agilent

- Источник ионизации электрораспылением (G1948B)

## Метод

В табл. 2 обобщены условия работы системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Prime, а в табл. 3 представлены параметры источника ионизации Ultivo и прибора. В табл. 4 приведены оптимизированные параметры МС для целевых соединений. Для сбора данных использовался динамический режим мониторинга множественных реакций (dMRM). Программное обеспечение MassHunter Quantitative Analysis B.09 с функцией Quant-My-Way применялось для ускорения и оптимизации анализа данных и процесса их обработки.

Таблица 2. Параметры системы ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Prime

Колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 2,1 × 100 мм, 2,7 мкм (кат. № 695775-906)
Температура колонки	40 °С
Наблюдаемый диапазон обратного давления в колонке	170–370 бар
Объем ввода	4 мкл
Подвижная фаза	А) 0,2% муравьиной кислоты в воде В) 0,5 мМ фторида аммония в метаноле
Скорость потока	0,350 мл/мин
Градиент	Время (мин) В, %
	0 2
	1,5 2
	2,5 70
	5,0 100
	7,0 100
	7,1 2
9,0 2	
Время элюирования	9,0 мин
Время промывки колонки после анализа	1,0 мин

Таблица 3. Параметры источника ионизации Ultivo и масс-анализатора

Температура газа	325 °С
Расход газа	8 л/мин
Давление в распылителе	40 psi (2,76 бар)
Напряжение на входе в капилляр	2 000 В (+)
Время цикла	500 мс

## Экспериментальный план

Свинина и молоко с добавками, внесенными после процедуры экстракции (с последующей добавкой), использовались для исследования чувствительности, воспроизводимости и линейности. Для определения степени извлечения в свинину и молоко был добавлен базовый раствор ветеринарных препаратов перед экстракцией (с предварительной добавкой), а также выполнено сравнение с экстрактами свинины и молока с последующей добавкой для расчета степени извлечения (%) после анализа.

## Результаты и их обсуждение

### Чувствительность и воспроизводимость метода

Все ветеринарные препараты можно точно количественно определить на уровне 1/2 MRL, тогда как большинство можно количественно определить на уровне 1/10 MRL, в данном исследовании тестировался самый низкий уровень. На рис. 3 продемонстрирован превосходный отклик для всех аналитов в экстракте свинины на целевом уровне тестирования. Ветеринарные препараты также демонстрируют превосходную воспроизводимость на самом низком уровне тестирования с ОСО менее 14% для всех протестированных соединений, а также самый низкий уровень тестирования, как показано в табл. 5. Точный количественный анализ на самом низком уровне тестирования определялся как четыре из шести повторных вводов с точностью 80–120% и соотношением «сигнал/шум» (С/Ш) более 10 как для квантификаторов, так и для квалификаторов. Несколько соединений ветеринарных препаратов имело очень сильный ответный сигнал при 1/10 MRL, что свидетельствует о том, что предел количественного определения значительно ниже 1/10 MRL (на рис. 4 приведено несколько примеров).

Таблица 4. Оптимизированные переходы для детектирования ветеринарных препаратов в динамическом режиме мониторинга множественных реакций

Соединение	Ион-предшественник (m/z)	Ион-продукт (m/z)	Время удерживания (RT) (мин)	Окно ВУ (мин)	Потенциал на фрагменте (В)	Эн. соудар. (В)	Полярность
Дигидрострептомицин	584,3	204	0,67	0,89	100	44	Положительная
Дигидрострептомицин	584,3	200	0,67	0,89	100	32	Положительная
Стрептомицин	599,3	582,3	0,67	0,69	160	12	Положительная
Стрептомицин	599,3	263	0,67	0,69	160	32	Положительная
Диминазин	282,2	254,1	4,5	0,77	90	0	Положительная
Диминазин	282,2	118,9	4,5	0,77	90	12	Положительная
Линкомицин	407,2	126	4,78	1,1	150	28	Положительная
Линкомицин	407,2	82,2	4,78	1,1	150	80	Положительная
Тетрациклин	445,2	427,1	4,86	0,81	130	4	Положительная
Тетрациклин	445,2	410,1	4,86	0,81	130	8	Положительная
Окситетрациклин	461,2	443,1	4,88	1,05	130	0	Положительная
Окситетрациклин	461,2	426	4,88	1,05	130	12	Положительная
Спирамицин	422,2	100,9	5	0,93	70	20	Положительная
Спирамицин	422,2	83	5	0,93	70	20	Положительная
Хлортетрациклин	479,1	444,1	5,09	1,1	140	12	Положительная
Хлортетрациклин	479,1	260,1	5,09	1,1	140	60	Положительная
Цефтиофур	524	241	5,21	0,97	140	8	Положительная
Цефтиофур	524	124,9	5,21	0,97	140	68	Положительная
Фенбендазол	300,1	268,1	5,98	1,05	140	16	Положительная
Фенбендазол	300,1	159	5,98	1,05	140	36	Положительная
Новобиоцин	613,2	133,1	6,6	0,85	120	68	Положительная
Новобиоцин	613,2	132,5	6,6	0,85	120	72	Положительная
Клозантел	662,9	264	7,29	0,8	180	28	Положительная
Клозантел	662,9	194,1	7,29	0,8	180	80	Положительная

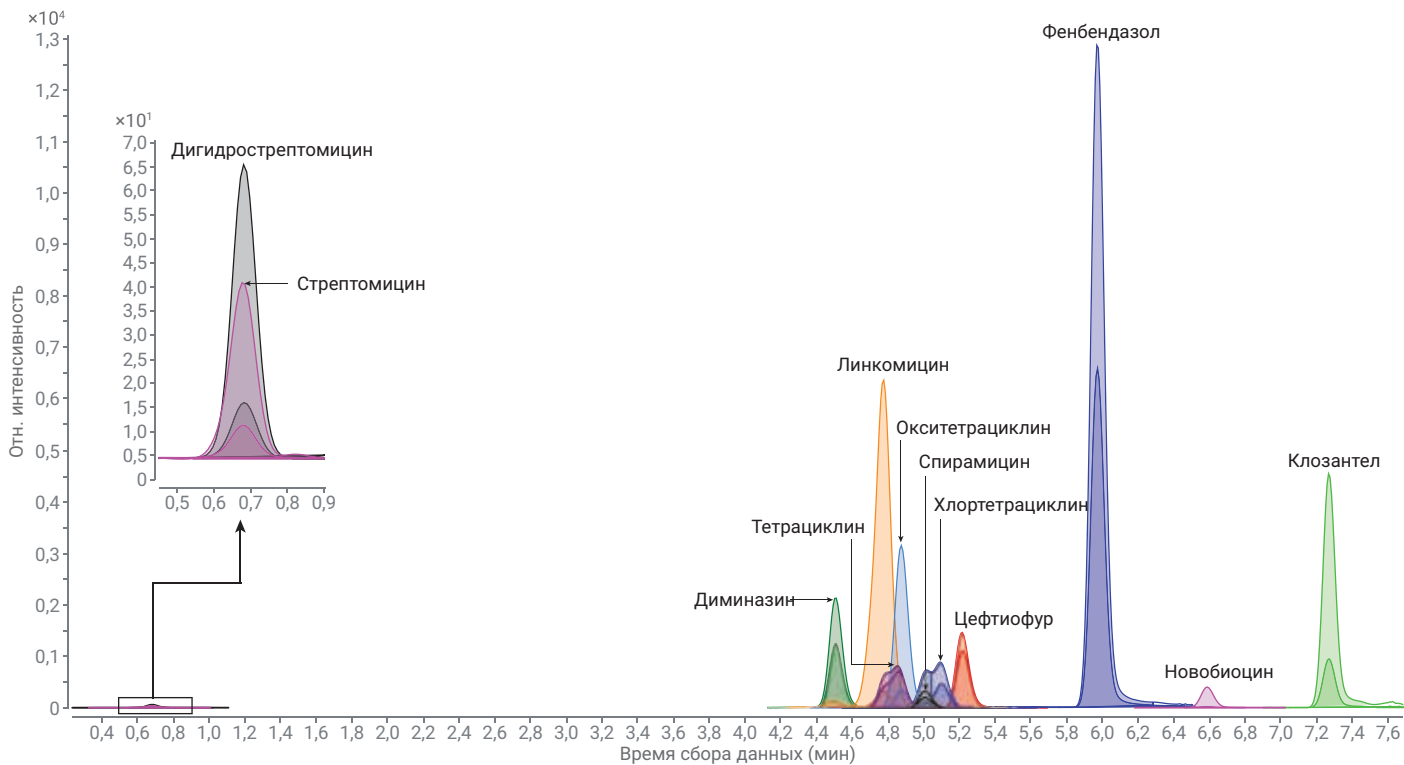


Рис. 3. Хроматограмма аналитов ветеринарных препаратов, добавленных в экстракт свинины на целевом уровне тестирования (1/2 MRL)

Таблица 5. Самый низкий уровень тестирования и воспроизведение для всех исследуемых ветеринарных препаратов в экстрактах свинины и молока. Все они могут быть точно количественно определены на целевом уровне тестирования (1/2 MRL) или ниже него

Соединение	Молоко		Свинина	
	Самый низкий уровень тестирования (мкг/кг)	ОСО% (n = 6)	Самый низкий уровень тестирования (мкг/кг)	ОСО% (n = 6)
Стрептомицин	1/2 MRL	62,5	13,74	6,92
Дигидрострептомицин	1/2 MRL	62,5	7,76	6,52
Диминазин	1/10 MRL	15	5,79	3,74
Линкомицин	1/10 MRL	15	2,02	0,83
Тетрациклин	1/10 MRL	10	3,26	3,48
Окситетрациклин	1/10 MRL	10	4,16	3,60
Спирамицин	1/10 MRL	20	4,34	5,39
Хлортетрациклин	1/10 MRL	10	3,38	3,46
Цефтиофур	1/10 MRL	10	11,56	2,22
Фенбендазол	1/10 MRL	10	1,10	1,26
Новобиоцин	1/5 MRL	10	10,93	4,13
Клозантел	1/10 MRL	4,5	4,75	3,60

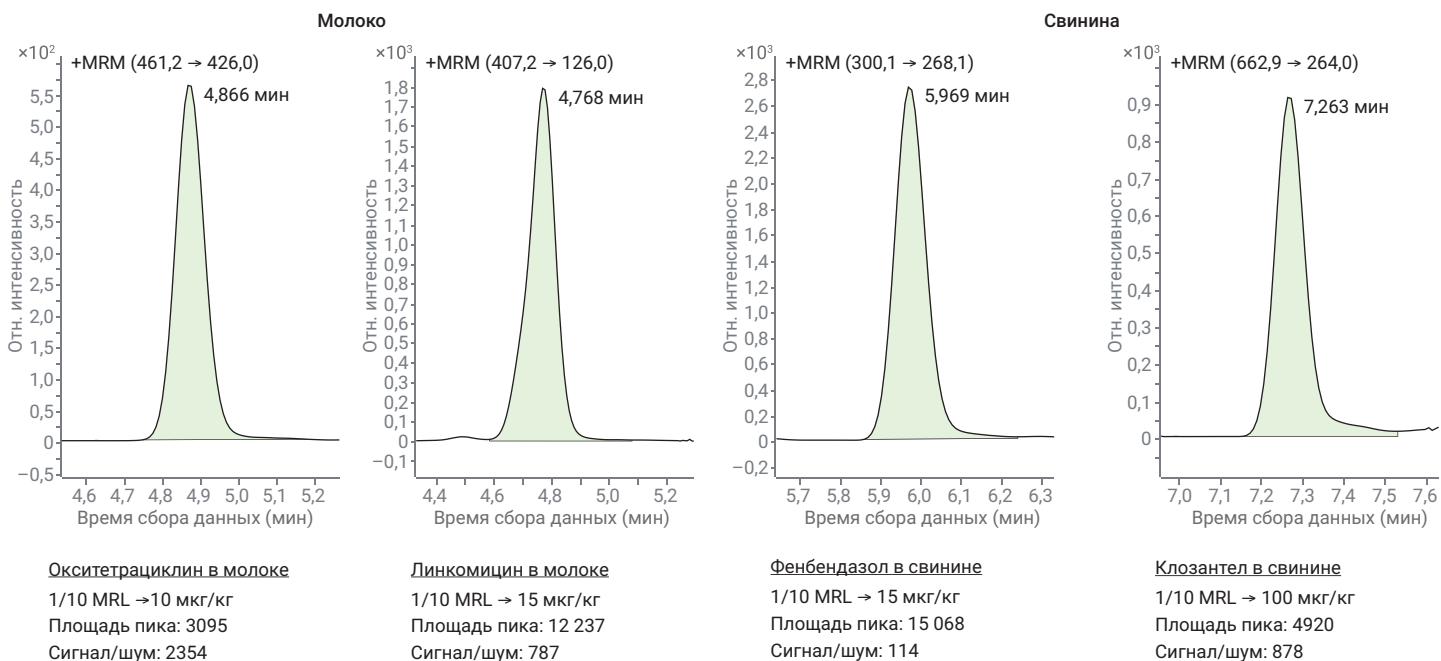


Рис. 4. Отдельные соединения ветеринарных препаратов с сильным ответным сигналом при 1/10 MRL, что свидетельствует о том, что предел количественного определения значительно ниже 1/10 MRL

### Линейность метода

Все ветеринарные препараты продемонстрировали хорошую линейность при коэффициенте 1/x, и все калибровочные кривые имели

значения  $R^2$  больше 0,98. Уровни калибровки варьировались от 1/10 MRL до 5x MRL для всех анализов. Рис. 5 демонстрирует примеры некоторых калибровочных кривых.

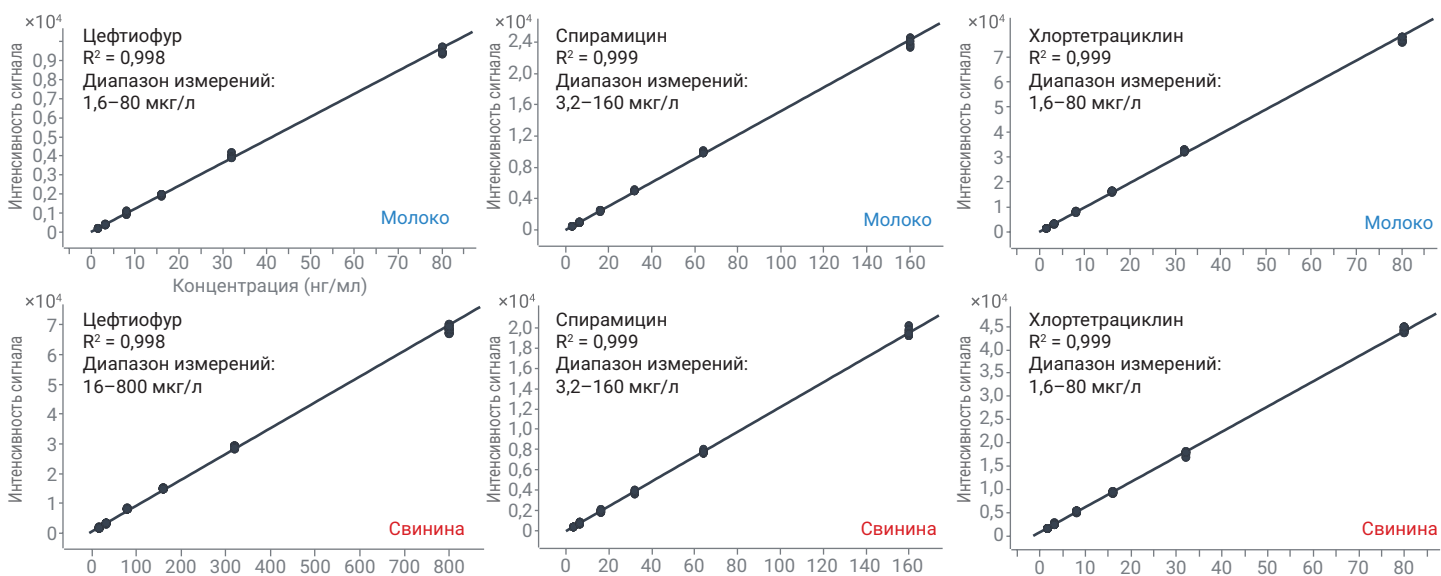


Рис. 5. Отдельные калибровочные кривые ветеринарных препаратов, добавленных в матрицы свинины и молока в концентрациях в диапазоне от 1/10 MRL до 5 x MRL

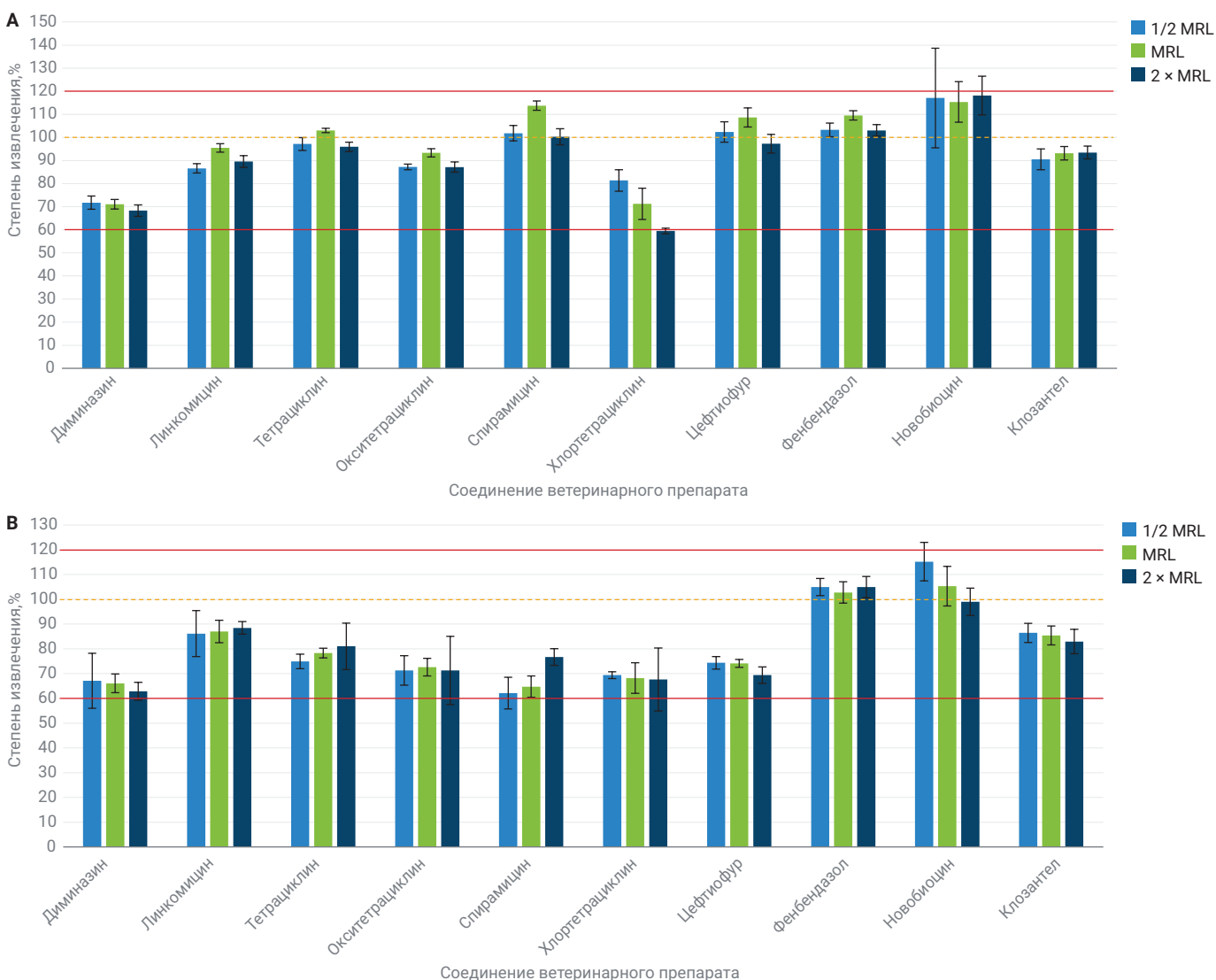
### Степень извлечения метода

Степень извлечения всех ветеринарных препаратов оценивалась как в молоке, так и в свинине на трех уровнях: 1/2 MRL, MRL и 2 × MRL.

В данном исследовании степени извлечения оценивалось шесть параллельных вводов каждого уровня добавок. Для 10 соединений

степень извлечения находилась в пределах между 60 и 120% на всех уровнях в обеих матрицах (рис. 6). Дигидрострептомицин и стрептомицин при данном методе экстракции отличались плохим извлечением, но могли детектироваться на целевом уровне тестирования (1/2 MRL) или ниже него в матрице с последующей

добавкой. Для этих двух очень гидрофильных соединений может использоваться иной метод экстракции, но данный метод анализа подходит для скрининга. Для точного количественного анализа следует использовать внутренние стандарты для корректировки потери этих двух соединений во время экстракции.



**Рис. 6.** Степень извлечения ветеринарных препаратов в молоке (А) и свинине (Б) при уровнях добавок 1/2 MRL, MRL и 2 × MRL. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение шести параллельных вводов. Дигидрострептомицин и стрептомицин не включены

## Выводы

Применение трехкврупольного масс-спектрометра Ultivo, оборудованного источником ионизации электроспреем, превосходило требования к MRL, установленные мировыми регулирующими органами в отношении анализа ветеринарных препаратов в мясе и молоке, и позволяло добиться превосходной воспроизводимости. Картриджи Captiva EMR–Lipid обеспечивали необходимую дополнительную очистку матрицы жирной свинины, что способствовало повышению чувствительности метода. Система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II Prime стала идеальным инструментом для разделения в условиях низкого обратного давления, наблюдаемого в этом методе. В методиках со сниженными требованиями к чувствительности данная конфигурация Ultivo с источником ионизации электроспреем является превосходным подходящим вариантом.

## Литература

1. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 21 CFR Части 514 и 558, FDA-2010-N-0155.
2. Proposal for a regulation of the European Parliament and of the council on veterinary medicinal products, Европейская комиссия, **2014/0257** (COD).
3. Maximum Residue Limits in animal derived foods, Уведомление № 235, Министерство сельского хозяйства, Китай, **2002**.
4. List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods, Здравоохранение Канады, Правительство Канады. 2 августа, **2017 г.** [https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr\\_versus\\_new-nouveau-20170802-eng.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-20170802-eng.pdf).
5. Zhao, L.; Lucas, D. Multiclass Multiresidue Veterinary Drug Analysis in Beef Using Agilent Captiva EMR–Lipid Cartridge Cleanup and LC/MS/MS. *Рекомендации по применению Agilent Technologies*, номер публикации 5991-8598EN, **2017**.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Информация в этом документе может быть изменена без уведомления.

© Agilent Technologies, Inc., 2018.  
Напечатано в США 13 декабря 2018 г.  
5994-0480RU