

The development and validation of a rapid method for the determination of antibiotics in milk by high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

O.V. Bayer¹, O.S. Yaremchuk², L.V. Shevchenko³, V.M. Mykhalska³

¹State Research Institute laboratory diagnostics and veterinary-sanitary expertise, Kiev, Ukraine

²National Agrarian University of Vinnytsia, Vinnytsia, Ukraine

³National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

E-mail: kot30@meta.ua, dep_rector@vsau.vin.ua, shevchenko_laris@ukr.net, vitam@bigmir.net

Submitted: 30.10.2017. Accepted: 12.12.2017

On the basis of the conducted research, validation of the method for the determination of sulfonamides and antibiotics in milk by screening method was developed and conducted by LC / MS / MS. It has been confirmed that a method determination by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC / MS / MS) is more sensitive and selective. Validation of the method was carried out in accordance with the Decision of the European Commission 2002/657 / EC of 12 August 2002, which ensures the implementation of Council Directive 96/23 / EC concerning the effectiveness of analytical methods and the interpretation of results, and in accordance with the recommendations of the reference laboratories of the European Union CRLs of 20/1/2010 on the assessment of the suitability of screening methods for the determination of veterinary drugs. It is proved that the adapted method for the determination of sulfonamides and antibiotics is sensitive and according to parameters meets the European requirements. This method is fast enough, practical and universal, since it allows simultaneous examination of about 70 antibacterial drugs at the same time in milk.

It has been established that the method of determining the residual amount of sulfonamides and antibiotics by the UPLC / MS / MS is suitable for the investigation of milk on the content of the following drugs: sulfaguanidine, sulfacetamide, sulfapiridine, sulfadiazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfabenzamide, sulfaquinolaxine, sulfadoxine, sulfadimetoxin, sulfanilamide, trimethoprim, sulfamonomethoxine, sulfamethoxy-pyridazine, sulfachlorpyridazine, sulfamoxol, dapsone, amoxicillin, ampicillin, penicillin G, penicillin V, oxacillin, cloxacillin, nafcillin, dicloxacillin, cefalonium, cefazolin, cefoperazon, cefquinome, cefapirin, ceftiofur, cefalexin, norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, difloxacin, danofloxacin, sarafloxacin, flumekvin, oxolinic acid, nalidixic acid, oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline, doxycycline, epi-oxytetracycline, epi-tetracycline, epi-chlortetracycline, streptomycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, kanamycin, apramycin, paromomycin, lincomycin, spectinomycin, tilmycosin, erythromycin, josamycin, spiramycin, tylosin, tiamulin, colistin, gamitromycin, tulatromycin. In assessing the suitability of the method, the MS / MS detection parameters are set and the validation characteristics are determined.

Key words: antibiotics; liquid chromatography method with MS-MS detector; method validation

Розробка та оцінка придатності методу з визначення антибіотиків у молоці за допомогою рідинної хроматографії високого тиску - тандемної мас-спектрометрії (UPLC-MS-MS)

О.В. Байєр¹, О.С. Яремчук², Л.В. Шевченко³, В.М. Михальська³

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи,
м. Київ

²Вінницький національний аграрний університет, м. Вінниця, Україна

³Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ

E-mail: kot30@meta.ua, dep_rector@vsau.vin.ua, shevchenko_laris@ukr.net, vitam@bigmir.net

На основі проведених досліджень розроблено та проведено оцінку придатності методики з визначення сульфаніламідних препаратів та антибіотиків в молоці сирому скринінговим методом за допомогою РХ/МС/МС. Підтверджено, що більш чутливим і селективним є метод, що базується на рідинній хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС). Оцінювання придатності методу проводили відповідно до Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року, яке забезпечує виконання Директиви Ради 96/23/ЄС, що стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів, а також відповідно до рекомендацій референс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010 щодо оцінки придатності скринінгових методів за визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів.

Доведено, що адаптована методика з визначення сульфаніламідних препаратів та антибіотиків є чутливою і за своїми параметрами відповідає європейським вимогам. Даний метод є досить швидким, практичним та універсальним, оскільки дає можливість одночасно досліджувати близько 70 антибактеріальних препаратів одночасно в молоці. Встановлено, що методика визначення залишкової кількості сульфаніламідних препаратів та антибіотиків методом РХ/МС/МС є придатною для дослідження продуктів тваринного походження на вміст наступних препаратів: сульфагуанідин, сульфацетамід, сульфапіридин, сульфадіазин, сульфаметоксазол, сульфатіазол, сульфамеразин, сульфаметизол, сульфабензамід, сульфаметазин, сульфхіноксолін, сульфадоксин, сульфадиметоксин, сульфаніламід, триметоприм, сульфамонетоксин, сульфаметохсипіридазин, сульфахлорпіридазин, сульфамоксол, дапсон, амоксицилін, ампіцилін, пеніцилін Ж, пеніцилін В, оксацилін, клоксацилін, нафцілін, диклоксацилін, цефалоніум, цефозолін, цефоперазон, цефквіном, цефопірін, цефтіофур, цефалексин, норфлоксацин, енрофлоксацин, ципрофлоксацин, марбофлоксацин, дифлоксацин, данофлоксацин, сарафлоксацин, флумекін, оксолінову кислоту, налідіксову кислоту, окситетрациклін, хлортетрациклін, тетрациклін, доксициклін, епі-окситетрациклін, епі-окситетрациклін, епі-хлортетрациклін, стрептоміцин, дигідрострептоміцин, гентаміцин, канаміцин, апраміцин, паромоміцин, лінкоміцин, спектиноміцин, тілмікозин, еритроміцин, йозаміцин, спіраміцин, тілозин, тіамулін, колістин, гамітроміцин, тулатроміцин. При оцінці придатності методу встановлено параметри МС/МС детектування та визначено валідаційні характеристики.

Ключові слова: антибіотики; метод рідинної хроматографії з МС-МС детектором; оцінювання придатності методу

Вступ

Антибактеріальні засоби, в тому числі антибіотики, широко використовуються у тваринництві як лікувальні засоби, а до недавнього і як стимулятори росту сільськогосподарських тварин і птиці (Dorohov, 2002; Cimitile, 2009).

Найбільш широко використовуються у ветеринарній медицині препарати тетрациклінової та сульфаніламідної груп. Зазначені препарати мають широкий спектр дії і часто використовуються при інфекційних захворюваннях шкіри, дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту і хворобах сечостатевої системи. Поряд з вищевказаними групами антибактеріальних препаратів використовують макроліди, фторхінолони, бета-лактами та інші.

Лабораторні дослідження показують, що залишкові кількості ветеринарних препаратів виявляються в нирках, печінці, м'язах, молоці та яйцях тварин. Тому застосування антибіотиків тваринам на відгодівлі передбачає витримування певний час до повного виведення цих препаратів з організму.

Дослідження показали, що основна маса введеного тварині антибіотика виводиться з організму в незміненому вигляді. Найбільш небезпечним наслідком використання антибіотиків в тваринництві може стати виникнення антибіотикорезистентних штамів бактерій, які не лише викликають алергічні реакції в організмі людей, знижують ефективність лікування інфекційних захворювань, а лей потребують розробки нових антимікробних препаратів. Тому в країнах ЄС та в Україні наявність залишкових кількостей ветеринарних препаратів, особливо антибіотиків, у продукції тваринного та рослинного походження суворо лімітується директивами.

Для визначення залишкової кількості антибіотиків використовують різні методи. Мікробіологічний метод використовується для скринінгу, він є чутливим і досить специфічним. Використовують також іммуноферментні тест-системи, які є також специфічні, але вони є більш затратні і часто потребують окрему тест-систему на кожний антибіотик. Багато аналітичних методів із визначення антибіотиків передбачає використання вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з флуоресцентним детектором, але він є недостатньо чутливим.

Більш чутливим і селективним є метод, що базується на рідинній хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектора (РХ/МС/МС), за допомогою якого можна дослідити понад 70 антибіотиків одночасно (Commission Regulation (EU) № 37/2010; Novozhytska Yu. M. et al., 2014; Boix C. et al., 2014; Cepurnieks G. et al., 2015; Berendsen B. et al., 2012; Freitas A. et al., 2013).

В Україні контроль за вмістом антибіотиків в продуктах тваринного походження обумовлює «План моніторингу залишків

ветеринарних препаратів та інших забруднювачів у живих та необроблених харчових продуктах тваринного походження», що виконується відповідно до Директиви 96/23/ЄС від 29 квітня 1996 року.

В країнах Європейського Союзу допустимий вміст залишкових кількостей антибіотиків в продуктах тваринного походження регламентовано максимально допустимими рівнями (МДР). Згідно регулювання ЄС 37/2010, що визначає порядок встановлення МДР для залишкових кількостей ветеринарних препаратів. Ці рівні у продуктах тваринного походження встановлюють відповідно вимог до чутливості методів, і відповідно до них проводиться оцінювання придатності методу.

Метою наукових досліджень є розробка та оцінка придатності методики з визначення антибіотиків в молоці скринінговим методом за допомогою РХ/МС/МС, яка дозволяє одночасно визначати близько 70 препаратів в молоці.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ). Під час оцінки придатності методу використовували рідинний хроматограф з подвійним мас-спектрометричним детектором Waters XEVO TQ-S micro. Використовували колонку аналітичну обернено-фазну Waters BEH C18 1,7 мкм, 100*2,1мм, рухома фаза була ацетонітрил та 0,1% мурашиною кислотою у воді.

Матеріалом для дослідження були зразки молока сирого та молока сухого, додатково перевірені на відсутність у них цільових аналітів. Збагачення контрольних зразків до рівня цільової концентрації скринінгу проводили стандартними розчинами. В роботі використовували сертифіковані субстанції антибіотиків.

Представлені зразки були без аномалій, чітко ідентифіковані, без ушкодження упаковки, з незакінченим терміном придатності. Зразки на час дослідження зберігалися при відповідних умовах, рекомендованих виробником.

Паралельно з досліджуванним зразком готували зразок з добавкою, проба контролю чистоти реактивів та референт-матеріалів.

Метод визначення включає три основні етапи:

- екстракція залишків антибіотиків ацетонітрилом або розчином трихлороцтової кислоти;
- концентрування та очищення екстракту;
- ідентифікація та кількісне визначення антибіотика методом РХ-МС/МС.

Оцінювання придатності методу проводили відповідно до Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року, яке забезпечує виконання Директиви Ради 96/23/ЄС, що стосується ефективності аналітичних методів та інтерпретації результатів, а також відповідно до рекомендацій референс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010 щодо оцінки придатності скринінгових методів за визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів.

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що скринінговий метод дозволяє виявити в біологічному зразку (продукти тваринного походження) наступні сульфаніламідні препарати та антибіотики: сульфагуанідин, сульфаметамід, сульфапіридин, сульфадіазин, сульфаметоксазол, сульфатіазол, сульфамеразин, сульфаметизол, сульфабензамід, сульфаметазин, сульфхіноксолін, сульфадоксин, сульфадиметоксин, сульфаніламід, триметоприм, сульфамонетоксин, сульфаметоксипіридазин, сульфаклорпіридазин, сульфамоксол, дапсон, амоксицилін, ампіцилін, пеніцилін Ж, пеніцилін В, оксацилін, клоксацилін, нафцілін, диклоксацилін, цефалоніум, цефозолін, цефоперазон, цефквіном, цефопірін, цефтіофур, цефалексин, норфлоксацин, енрофлоксацин, ципрофлоксацин, марбофлоксацин, дифлоксацин, данофлоксацин, сарафлоксацин, флумекін, оксолінову кислоту, налідіксову кислоту, окситетрациклін, хлортетрациклін, тетрациклін, доксициклін, епі-окситетрациклін, епі-окситетрациклін, епі-хлортетрациклін, стрептоміцин, дигідрострептоміцин, гентаміцин, канаміцин, апраміцин, паромоміцин, лінкоміцин, спектиноміцин, тілмікозин, еритроміцин, йозаміцин, спіраміцин, тілозин, тіамулін, колістин, гамітроміцин, тулатроміцин.

Кількісне визначення масової концентрації антибіотиків не проводили, обрахунок результату проводили за площами піків з використанням внутрішнього стандарту на рідинному хроматографі з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Waters XEVO TQ-S micro або на аналогічному приладі. Ідентифікацію проводили за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності.

При адаптації методики на приладі проводили його налаштування до антибіотиків (тюнінг) шляхом введення стандартних розчинів високої концентрації на детектор. При цьому визначали материнський іон, напругу на конусі, дочірні іони та напругу на капілярі. Отже, для успішного визначення вмісту антибіотиків у зразках методом РХ/МС/МС важливо чітко встановити параметри для МС/МС детектування.

Рідинний хроматограф із тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором готували згідно інструкції з експлуатації приладу та задавали робочі параметри. Дослідження проводили з використанням позитивного електроспрею, температуру термостату колонки встановлювали на рівні 40 °С з використанням градієнтного режиму елювання.

Градiєнт був наступний: до 1 хвилини – 98 % розчин 0,1 % розчин мурашиної кислоти, з 3 хвилини – 60 % розчин ацетонітрилу, з 5 хвилини – 90 % розчин ацетонітрилу, на 6 хвилині – 98 % розчин 0,1 % розчин мурашиної кислоти.

Для експериментального дослідження придатності методики спочатку встановлювали величину цільової концентрації скринінгу. Цей термін означає концентрацію, при якій скринінг-метод класифікує зразок як скринінг-позитивний (той, що потенційно не відповідає встановленим нормам) та потребує додаткового дослідження із застосуванням методу підтвердження.

Таблиця 1. ACN (ацетонітрил) екстракція

	Компонент	Час утримання	m / Z (Q 1 / Q 3) 1	m / Z (Q 1 / Q 3) 2
1.	Сульфагуанідин	1.0	215/156	215/108
2.	Сульфацетамід	1.7	215/156	215/108
3.	Сульфapіридин	2.0	250/156	250/108
4.	Сульфадіазин	1.8	251/156	251/108
5.	Сульфаметоксазол	2.9	254/156	254/108
6.	Сульфатіазол	2.1	256/108	256/108
7.	Сульфамеразин	2.0	265/108	265/156
8.	Сульфаметизол	2.4	271/156	271/108
9.	Сульфабензаїд	3.2	277/156	277/108
10.	Сульфаметазин	2.2	279/156	279/108
11.	Сульфхіноксолін	3.3	301/156	301/108
12.	Сульфадоксин	2.8	311/156	311/108
13.	Сульфадиметоксин	3.3	311/156	311/108
14.	Пеніцилін G	3.8	335/160	335/175
15.	Цефалексин	2.8	348/156	348/106
16.	Ампіцилін	2.7	350/106	350/160
17.	Пеніцилін V	4.2	351/160	351/114
18.	Амоксицилін	2.2	366/114	366/208
19.	Марбофлоксацин	3.1	363/345	363/320
20.	Нафцилін	4.6	415/199	415/171
21.	Тилмікозин	4.3	435,5/174	435/695
22.	Клоксацилін	4.5	436/160	436/277
23.	Цефазолін	2.6	455/323	455/156
24.	Цефалоніум	2.4	459/337	459/152
25.	Диклоксацилін	4.8	470/160	470/311
26.	Цефоперазон	3.0	646/530	646/143
27.	Колістин	3.8	391/101	391/241
28.	Цефтіофур	4.0	522/123	522/233
29.	Тіамулін	4.1	494/119	494/192
30.	Цефопірин	2.6	424/152	424/124
31.	Цефквіном	2.7	529/134	529/125
32.	Триметоприм	2.9	291/230	291/123
33.	Сульфамонетоксин	2.8	281/156	281/108
34.	Сульфаметохсипіридазин	2.7	281/156	281/108
35.	Сульфаклорпіридазин	2.8	285/156	285/108
36.	Сульфамоксол	2.9	268/156	268/108
37.	Еритроміцин	4.1	734/158	734/576
38.	Йозаміцин	4.6	829/174	829/229
39.	Спіраміцин	3.5	844/174	844/540
40.	Тилозин	4.2	916/174	916/772
41.	Дапсон	2.9	249/156	249/108
42.	Гамітроміцин	4.0	778/158	778/619

Для зареєстрованих препаратів вона встановлюється на рівні або нижче МДР (якщо дозволяє метод – то на рівні ½ МДР). Для заборонених ветеринарних препаратів цільова концентрація повинна бути встановлена на рівні МНМВ (мінімально необхідна межа визначення). Для препаратів, з не встановленими МДР (максимально-допустимий рівень)

та МНМВ, ця величина повинна бути на найнижчому рівні. Оскільки чим нижчою є цільова концентрація скринінг-методу, тим меншою є ймовірність одержання помилкового негативного результату у зразках, які містять залишки на рівні регуляторної межі. На рівні цієї концентрації і була збагачена матриця чистого контрольного зразка, з метою встановлення рівня відсікання аналізу, що визначається.

Екстракцію зразка проводили 5 % розчином трихлороцтової кислоти (ТСА) в кількості 6 мл. ТСА екстракцію проводили для таких сульфаніламідних препаратів та антибіотиків як сульфаніламід, норфлоксацин, ципрофлоксацин, спектиноміцин, данофлоксацин, енрофлоксацин, дапсон, сарафлоксацин, дифлоксацин, доксициклін, тетрациклін, окситетрациклін, хлортетрациклін, канаміцин, апраміцин, стрептоміцин, дигідрострептоміцин, паромоміцинеритроміцин, йозаміцин, спіраміцин, ті лозин. Інші антибіотики екстрагувались 6 мл ацетонітрилу, випаровували до 200 мкл та після очистки за допомогою шприцьового фільтру досліджували на приладі.

Для проведення валідації даної скринінг-методики було досліджено 20 зразків матриці (контрольного чистого молока сирого) та 20 збагачених зразків стандартними розчинами антибіотиків на рівні ½ МДР. Підготовку зразків виконували за новою розробленою методикою, аналіз проводили у різні дні, з урахуванням можливих змін експлуатаційного режиму, що мають безпосередній вплив на виконання даних досліджень. Ідентифікацію сульфаніламідних препаратів та антибіотиків проводили за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності (табл. 1-2).

Ми використовували підхід розрахунку рівня відсікання для скринінг-методів: При цьому підході оцінюють ряд результатів, отримані при аналітичних реакціях контрольних («пустих») та збагачених зразків. Вибирають найнижчу відповідь, отриману для збагачених зразків. Це значення буде межею відсікання за умови, що воно не буде перекривати найвище значення, отримане для контрольних проб.

Одним із найважливіших показників оцінювання придатності методу є ССа та ССВ. ССа є важливим показником для оцінювання придатності підтверджуючих методів, а ССВ – для скринінгових. ССа – межа рішення, вище якої можна прийти до висновку з імовірністю помилки α , що зразок є невідповідним.

Таблиця 2. ТСА (трихлороцтова) екстракція

Компонент	Час утримання	m / Z (Q 1 / Q 3) 1	m / Z (Q 1 / Q 3) 2
43. Сульфаніламід	0.7	173/143	173/97
44. Норфлоксацин	3.2	320/302	320/233
45. Ципрофлоксацин	3.2	332/314	332/231
46. Спектиноміцин	1.9	351/333	351/207
47. Данофлоксацин	3.3	358/340	358/257
48. Енрофлоксацин	3.4	360/342	360/288
49. Налідиксова кислота	4.1	233/215	233/187
50. Флумеквін	4.4	262/244	262/202
51. Оксолинова кислота	3.5	262/244	262/216
52. Сарафлоксацин	3.6	386/368	386/348
53. Дифлоксацин	3.7	400/382	400/356
54. Доксициклін	4.2	445/428	445/321
55. Тетрациклін	3.4	445/410	445/427
56. Окситетрациклін	3.2	461/426	461/443
57. Хлортетрациклін	4.0	479/444	479/462
58. Епі-тетрациклін	3.2	445/410	445/427
59. Епі-хлортетрациклін	3.8	479/444	479/462
60. Епі-окситетрациклін	3.0	461/426	461/443
61. Канаміцин	2.5	485/163	485/205
62. Апраміцин	3.0	540/217	540/378
63. Стрептоміцин	2.1	582/263	582/246
64. Дигідрострептоміцин	2.2	584/263	584/246
65. Лінкоміцин	2.8	407/126	407/359
66. Неоміцин	3.2	308/455	308/163
67. Гентаміцин	4.2	478/322	478/157
68. Паромоміцин	3.0	616/163	616/293
69. Тулатроміцин	3.8	807/158	807/577
70. Сульфафеназол (внутрішній стандарт)	3.3	315/156	-

ССВ – це найменший вміст досліджуваної речовини, який можна виявити, ідентифікувати або визначити кількісно у пробі з імовірністю похибки β .

В результаті проведених досліджень адаптовано методику визначення 20 сульфаніламідних препаратів, які широко застосовуються для лікування сільськогосподарських тварин і птиці, та можуть накопичуватися у продуктах харчування тваринного походження (табл. 3).

Серед переліку антибіотиків, що застосовуються у ветеринарній медицині скринінговий метод виявився чутливим до антибіотиків груп тетрациклінового ряду, фторхінолонів, аміноглікозидів, В-лактамів та макролідів. Більшість з цих препаратів тривалий час використовується як засоби профілактики та лікування інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці, що передбачає їх обов'язковий контроль у продуктах харчування.

Як видно з даних табл. 3 вміст сульфаніламідних препаратів, що використано для досліджень, нормується у продуктах тваринного походження, тоді як вміст деяких антибіотиків на прикладі молока сирого не нормуються. Наприклад, фторхінолони такі як норфлоксацин, сарафлоксацин, діфлоксацин, оксолинова кислота, налідиксова кислота; аміноглікозиди такі як апраміцин, парамоміцин та макроліти такі як йозаміцин, тіамулін, гамітроміцин, тулатроміцин. Таким чином, можна вважати скринінговий метод ефективним для контролю залишків препаратів антимікробного спектру дії у продуктах тваринного походження.

Таблиця 3. Оцінка придатності методу (молоко сире)

№	Назва показника	ССВ	МДР за нормативними документами, мкг/кг	№	Назва показника	ССВ	МДР за нормативними документами, мкг/кг
сульфаніаміди				аміноглікозиди			
1	Сульфагуанідин	<50,0	100,0	35	Стрептоміцин	<100,0	200,0
2	Сульфацетамід	<50,0	100,0	36	Дигідрострептоміцин	<100,0	200,0
3	Сульфапиридин	<50,0	100,0	37	Спектиноміцин	<100,0	200,0
4	Сульфадіазин	<50,0	100,0	38	Лінкоміцин	<75,0	150,0
5	Сульфаметоксазол	<50,0	100,0	39	Канаміцин	<75,0	150,0
6	Сульфатіазол	<50,0	100,0	40	Апраміцин	<100,0	н/р
7	Сульфамеразин	<50,0	100,0	41	Парамоміцин	<100,0	н/р
8	Сульфаметизол	<50,0	100,0	42	Гентаміцин	<50,0	100,0
9	Сульабензамід	<50,0	100,0	В-лактами			
10	Сульфаметазин	<50,0	100,0	43	Амоксицилін	<2,0	4,0
11	Сульфхіноксолін	<50,0	100,0	44	Ампіцилін	<2,0	4,0
12	Сульфадоксин	<50,0	100,0	45	Пеніцилін Ж	<2,0	4,0
13	Сульфадиметоксин	<50,0	100,0	46	Пеніцилін В	<2,0	н/р
14	Сульфаніламід	<50,0	100,0	47	Оксацилін	<15,0	30,0
15	Триметоприм	<25,0	50,0	48	Клоксацилін	<15,0	30,0
16	Сульфамонотетоксин	<50,0	100,0	49	Нафцілін	<15,0	30,0
17	Сульфаметохсипіридазин	<50,0	100,0	50	Диклоксацилін	<15,0	30,0
18	Сульфаклорпіридазин	<50,0	100,0	51	Цефалоніум	<10,0	20,0
19	Сульфамоксол	<50,0	100,0	52	Цефозолін	<25,0	50,0
20	Дапсон	<2,5	5,0	53	Цефоперазон	<25,0	50,0
тетрацикліни				54	Цефквіном	<10,0	20,0
21	Доксициклін	<50,0	100,0	55	Цефопірін	<30,0	60,0
22	Тетрациклін +Епі	<50,0	100,0	56	Цефтіофур	<50,0	100,0
23	Окситетрациклін+Епі	<50,0	100,0	57	Цефалексин	<50,0	100,0
24	Хлортетрациклін+Епі	<50,0	100,0	макроліди			
фторхінолони				58	Тілмикозин	<25,0	50,0
25	Маброфлоксацин	<50,0	75,0	59	Еритроміцин	<20,0	40,0
26	Норфлоксацин	<15,0	н/р	60	Йозаміцин	<20,0	н/р
27	Ципрофлоксацин	<50,0	100,0	61	Спіраміцин	<100,0	200,0
28	Данофлоксацин	<15,0	30,0	62	Тілозин	<25,0	50,0
29	Енрофлоксацин	<50,0	100,0	63	Тіамулін	<25,0	н/р
30	Сарафлоксацин	<15,0	н/р	64	Колістин	<25,0	50,0
31	Діфлоксацин	<15,0	н/р	65	Гамітроміцин	<25,0	н/р
32	Оксолинова кислота	<50,0	н/р	66	Тулатроміцин	<25,0	н/р
33	Налідиксова кислота	<50,0	н/р				
34	Флюмеквін	<25,0	50,0				

Примітка: н/р – не регламентується

Після проведення оцінки придатності методу вищевказаним методом ССВ для більшості сульфаніламідних препаратів та антибіотиків становить $\frac{1}{2}$ МДР.

Висновки

Адаптована методика з визначення сульфаніламідних препаратів та антибіотиків є чутливою і за своїми параметрами відповідає європейським вимогам.

На основі експериментальних даних встановлено, що методика визначення залишкової кількості сульфаніламідних препаратів та антибіотиків методом РХ/МС/МС є придатною для дослідження продуктів тваринного походження і може успішно використовуватися лабораторіями ветеринарної медицини.

Даний метод є досить швидким, практичним та універсальним, так як дає можливість одночасно досліджувати близько 70 антибактеріальних препаратів одночасно в молоці.

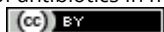
При оцінці придатності методу встановлено параметри МС/МС детектування та визначено валідаційні характеристики.

References

- Berendsen, B., Wegh, R., Essers, M., Stolker, A., Weigel, S. (2012). Quantitative trace analysis of a broad range of antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402, 1611–1623.
- Boix, C., Ibanez, M., Sancho, J.V., Leon, N., Yusa, V., Hernandez, F. (2014). Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chem.*, 160, 313–20.
- Cepurnieks, G., Rjabova, J., Zacs, D., Bartkevics, V. (2015). The development and validation of a rapid method for the determination of antimicrobial agent residues in milk and meat using ultra performance liquid chromatography coupled to quadrupole- Orbitrap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.*, 102, 184–92.
- Commission Decision 2002/657/EC of 12 August Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Result, European Commission, Brussels.
- Commission Regulation (EU) № 37/2010. Official journal of the European Commission. 2010. L 15. 72 p.
- Dorohov, S.M. (2002). *Farmakolohyia*. Kharkov: Yzdatelskyit sentr KhAY (in Russian).
- Freitas, A., Barbosa, J., Ramos, F. (2013). Development and validation of a multiresidue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. *Int Dairy J.*, 33(1), 38–43.
- Gaudin, V., Hedou, C., Sanders, P. (2007). Validation of a Biacore Method for Screening Eight Sulfonamides in Milk and Porcine Muscle Tissues According to European Decision 2002/657/EC. *J. OFAOAC International*, 90(6), 1706–1715.
- Kotsiumbas, I.Ya., Yanovych, D.V., Zasadna, Z.S. (2011). *Metodychni vказivky z otsinky prydatnosti metodyk imunofermentnoho analizu dlia skryninhovoho vyznachennia zalyshkovykh kilkostei veterynarykh preparativ ta zabrudniuvachiv u kharchovii syrovyni tvarynnoho pokhodzhennia*. Lviv.
- Novozhytska, Yu.M., Ivanova, O.V., Bondarets, O.V. (2013). *Metodychni rekomendatsii z validatsii skryninhovykh ta pidtverdzhuiuchykh metodiv vyznachennia zalyshkovykh kilkostei veterynarykh preparativ metodom hazovoi ta ridynnoi khromatohrafii*. K., DNDILDVSE. 33 (in Ukrainian).
- Novozhytska, Yu.M., Ivanova, O.V., Stupak, O.M., Vasyliuk, V.V., Liniichuk, N.V., Korostinska, N.V. (2014). *Vyznachennia antybiotykyv u produktsii tvarynno hopokhodzhennia za dopomohoiu ridynnoho khromatomas-spektrometra*. Kiev. DNDILDVSE (in Ukrainian).
- Tochnost (pravylnost y pretsyzyonnost) metodov y rezultatov yzmerenyi. Chast 2. (2002). *Osnovnoi metod opredeleniya povtoriaemosti y vosproyzvodymosti standartnoho metoda yzmerenyi: HOST R YSO 5752-2-2002*. – [Vveden v deistvye ot 2002-11-01]. Moscow: YPK Yzdatelstvo standartov (in Russian).

Citation:

Bayer, O.V., Yaremchuk, O.S., Shevchenko, L.V., Mykhalska, V.M. (2017). The development and validation of a rapid method for the determination of antibiotics in milk by high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ukrainian Journal of Ecology*, 7(4), 569–575.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License
