

РОЗРОБКА МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКІВ ЕНРАМІЦИНУ У ЗРАЗКАХ М'ЯСА ПТИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ УЛЬТРАЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З ТАНДЕМ-МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

*Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. І. Плотиця, молодший науковий співробітник,
А. М. Заярнюк, старший лаборант з вищою освітою*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

У статті представлено результати розробки та впровадження УЕРХ-МС/МС методу для визначення залишків поліпептидного антибіотика енраміцину у м'язових тканинах курей. Пробопідготовка зразків включає гомогенізацію, екстракцію у системі «рідина-рідина» з використанням водних та метанольних розчинів трифлуороцтової кислоти, очистку на октадецильних картриджах для твердофазного екстрагування, концентрування, перерозчинення у мобільній фазі та фільтрування. Основними перевагами розробленої методики є експресність хроматографічного розділення, висока селективність та чутливість (межа виявлення енраміцину А становить 5 мкг/кг, а енраміцину В – 4 мкг/кг). Методику апробовано при аналізі реальних та навантажених зразків м'яса птиці (CV ~ 20 %).

Ключові слова: ПОЛІПЕПТИДНІ АНТИБІОТИКИ, ЕНРАМІЦИН, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, УЕРХ-МС/МС, М'ЯСО ПТИЦІ.

Антимікробні препарати часто застосовуються у птахівництві для лікування та профілактики різноманітних інфекційних захворювань. Іноді ці препарати додають до кормів на рівнях субтерапевтичних концентрацій, як антимікробні стимулятори росту, впродовж всього періоду зростання птиці [1], що може спричиняти появу антибіотикорезистентних штамів патогенних бактерій і знижувати ефективність відомих антибіотиків, призначених для лікування людини. З цієї причини стимулятори росту, такі як поліпептидні антибіотики: бацитрацин, колістин, вірджиніаміцин, енраміцин [2], заборонені для використання в якості кормових добавок, зокрема, у країнах Європейського Союзу [3]. Це, у свою чергу, зумовлює необхідність розробки та проведення суворого контролю продукції тваринного походження стосовно залишкових кількостей поліпептидних антибіотиків. Так, в країнах ЄС встановлено їх максимально допустимі рівні (МДР): для бацитрацину (сумарний вміст бацитрацину А, В і С) – 150 мкг/кг у м'ясі та 100 мкг/кг у молоці, для колістину (сумарний вміст колістину А і В) – 150 мкг/кг у м'ясі та 50 мкг/кг у молоці [4]. Оскільки вірджиніаміцин та енраміцин заборонені в європейських країнах, то їх максимально допустимі рівні законодавчо не встановлені [2]. Однак, в Японії та Кореї встановлено МДР для енраміцину в курячому м'ясі та субпродуктах на рівні 30 мкг/кг [1].

Енраміцин (ендурацидин) – поліпептидний антибіотик, що складається з 17 амінокислотних залишків та продукується бактеріями *Streptomyces fungicidicus* [1, 5]. Вперше виділений в Японії зі зразка ґрунту в 1967 р. [6]; ефективний щодо грам-позитивних бактерій,

має ростостимулюючий ефект стосовно порослят, курчат, в тому числі бройлерів [5, 7, 8]. Основними компонентами енраміцину є гомологи енраміцин А та енраміцин В, які відрізняються між собою тільки одним замісником (рис. 1) [1, 9]. Склад цього антибіотика може відрізнятися за співвідношенням його компонентів: переважно вміст енраміцину А становить ~ 45-70 %, а енраміцину В ~ 30 %. Енраміцин стабільний у сухій формі, а також у водних розчинах за рН 3,5–7,5 [10]. Добре розчинний у розведених розчинах хлоридної кислоти та диметилформаміді, слабо розчинний у воді та метанолі, мало розчинний в ацетоні, етанолі, хлороформі, бензені.

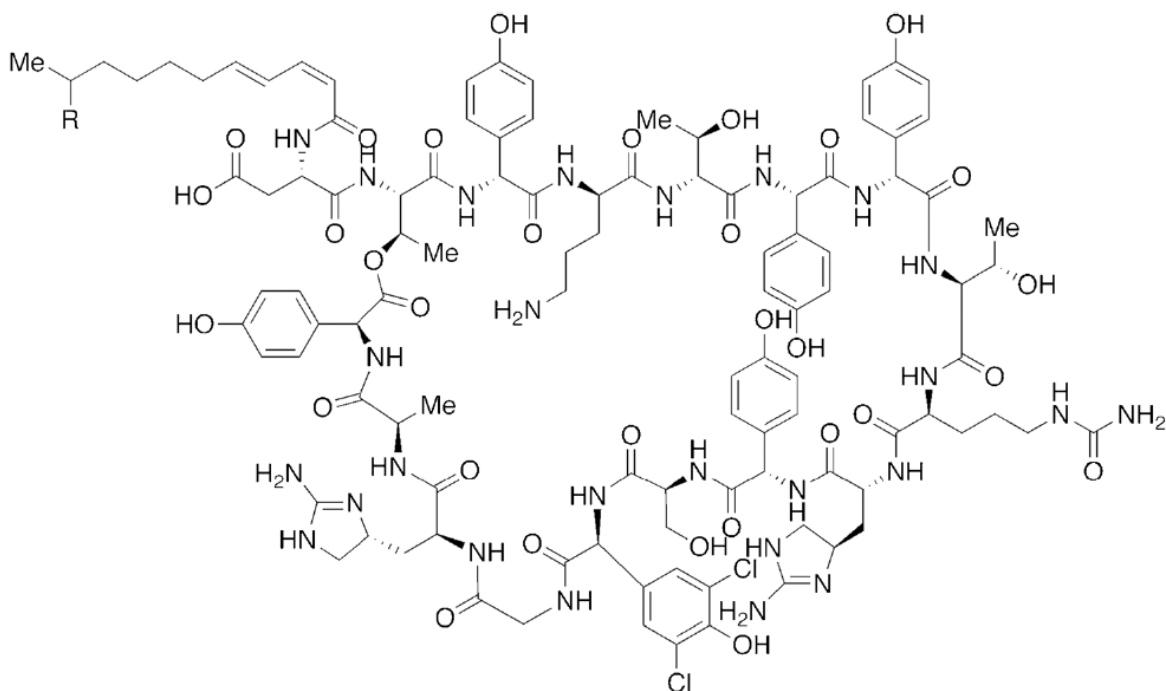


Рис. 1. Хімічна структура основних компонентів енраміцину: енраміцину А (R=CH₃-; [C₁₀₇H₁₃₈N₂₆Cl₂O₃₁], M=2355,3 а.о.м.) та енраміцину В (R=C₂H₅-; [C₁₀₈H₁₄₀N₂₆Cl₂O₃₁], M=2369,4 а.о.м.) [1].

З огляду літературних джерел виявлено відносно небагато досліджень стосовно аналізу залишків поліпептидних антибіотиків, зокрема енраміцину, у продуктах харчування тваринного походження. Так, в 1985 році опубліковано роботу щодо кількісного визначення енраміцину у м'язовій тканині курчат і порослят методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ-детектуванням з межею детектування 200 мкг/кг [11]. Описано також методику одночасного визначення залишків ряду поліпептидних антибіотиків, в тому числі, енраміцину, у продуктах тваринного походження методом тонкошарової хроматографії [12]. Перший опублікований метод підтвердження залишків енраміцину А та енраміцину В у м'язах курчат наведено у статті Бойсона та ін. 2015 р. [1]. У роботі описано розроблену методику одночасного кількісного визначення семи поліпептидних антибіотиків методом ультраефективної рідинної хроматографії з тандем-маспектронетричним детектуванням (УЕРХ-МС/МС) після рідинної екстракції розчином трифлуороцтової кислоти та очистки шляхом твердофазного екстрагування (ТФЕ) на октадецильних картриджах. Авторам вдалося досягнути межі детектування енраміцину А на рівні 20 мкг/кг, енраміцину В – 15 мкг/кг; межа кількісного визначення відповідно становила 66 та 50 мкг/кг, відповідно. Опубліковано також застосування ВЕРХ-МС/МС методики для визначення бацитрацину, колістину, поліміксину В, вірджиніаміцину і енраміцину (межа визначення енраміцину А 42 мкг/кг) у м'ясі та молоці за попередньої очистки зразків на іонообмінних картриджах для ТФЕ [2].

Тому, у зв'язку з поширенням проблеми антибіотикорезистентності, а також з підвищенням вимог до контролю безпечності продукції тваринного походження, зокрема, м'яса птиці, нами розроблено та впроваджено метод одночасного кількісного визначення енраміцину А та енраміцину В у м'язових тканинах курчат експресним високочутливим та високоселективним методом УЕРХ-МС/МС.

Матеріали і методи. *Реактиви.* Метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore), форміатна кислота (Riedel-de-Haën), хлоридна кислота (Riedel-de-Haën), трифлуороцтова кислота (Fluka Analytical), ацетонітрил (for HPLC, Sigma-Aldrich), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich), гексан (for HPLC, Lab-Scan).

Стандарт. Стандарт енраміцину (ТОКУ-Е, E006, Enramycin A / Enramycin B ~ 70/30). Основний стандартний розчин енраміцину готували з первинною концентрацією 1 мг/мл у 0,1 % форміатній кислоті у метанолі. Наступні розчини стандарту енраміцину з концентрацією 100, 10,0 та 1,0 мкг/кг готували послідовними розведеннями в 0,1 % форміатній кислоті у метанолі, а 100 нг/мл енраміцину та нижчі концентрації – у 0,1% форміатній кислоті в 30 % розчині метанолу. Розчини зберігали впродовж місяця у щільно закритому посуді в темному місці за температури 2-4 °С.

Обладнання. Рідинний хроматограф Waters ACQUITY UPLC H-Class з тандемним квадрупольним мас-спектрометричним детектором Waters Xevo TQ-S Micro, обладнаний колонкою ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 µm, 50 mm x 2,1 mm) із передколонукою ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard (1,7 µm, 5 mm x 2,1 mm) фірми Waters (США).

Приготування зразків. Зважували 5 г гомогенізованого м'яса птиці у 50 мл поліпропіленову центрифужну пробірку, додавали 10 мл 1 % трифлуороцтової кислоти у метанолі, струшували на роторному шейкері впродовж 20 хв (програма F4 90 rpm) та центрифугували впродовж 10 хв за 4700 rpm і температури 4 °С. Надосадову рідину переносили в іншу 50 мл поліпропіленову центрифужну пробірку. До залишку послідовно вносили 5 мл 1 % трифлуороцтової кислоти в метанолі та 15 мл 1 % трифлуороцтової кислоти у воді, струшували на роторному шейкері впродовж 20 хв (програма C3 80 rpm) та центрифугували впродовж 10 хв за 4700 rpm і температури 4 °С. Отримані екстракти об'єднували, вносили 15 мл 1 % трифлуороцтової кислоти у воді, струшували на роторному шейкері впродовж 5 хв (програма C3 80 rpm) та центрифугували впродовж 10 хв за 4700 rpm і температури 4 °С. Надосадову рідину пропускали через паперовий фільтр («біла стрічка») в конічну колбу об'ємом 10 мл і додавали до фільтрату 15 мл 0,1 М хлоридної кислоти.

Для очистки і концентрування отриманого екстракту використовували твердофазне екстрагування на картриджах UCT C18 SEC 200 мг / 3 мл. Для цього кондиціонували картридж послідовно 3 мл метанолу, 3 мл води та 3 мл 0,1 М HCl, наносили підготований екстракт зі швидкістю приблизно 1 кр./с. Залишків рідини з картриджа позбувалися вакуумом впродовж 20 хв. Картридж послідовно промивали 9 мл етилацетату, 15 мл 1 % форміатної кислоти в етилацетаті та 9 мл гексану і сушили у вакуумі 2 хв. Елюювання енраміцину проводили у скляні центрифужні пробірки двома порціями по 2 мл розчину 80 % метанолу / 20 % ацетонітрилу (об. / об.).

Отриманий елюат випаровували до сухого залишку на роторному випарювачі, перерозчиняли у 300 мкл 0,1 % форміатної кислоти в метанолі, екстрагували аналіт на вортексі 20 с та витримували в ультразвуковій бані впродовж 5 хв за кімнатної температури. Додавали 700 мкл 0,1 % форміатної кислоти у воді, перемішували на вортексі 20 с та продовжували екстрагування в ультразвуковій бані впродовж 5 хв. Після цього розчин фільтрували через політетрафлуоретиленовий шприцевий фільтр (розмір пор 0,2 мкм) у віалу для хроматографічного аналізу. Фактор концентрування – 5.

Побудова калібрувального графіка. Для побудови калібрувального графіка використовували робочі розчини стандарту енраміцину, концентрації енраміцину А та

енраміцину В обчислювали згідно із сертифікатом стандартного зразка енраміцину, а саме: вміст енраміцину А – 70 %, а енраміцину В – 30 % (табл. 1).

Таблиця 1

Схема побудови калібрувального графіка на стандартних розчинах енраміцину для визначення його залишків у м'ясі птиці

Концентрація стандарту енраміцину, нг/мл	Концентрація стандарту енраміцину А, нг/мл	Концентрація стандарту енраміцину В, нг/мл
0	0	0
2,0	1,4	0,6
5,0	3,5	1,5
10,0	7,0	3,0
20,0	14,0	6,0
50,0	35,0	15,0
100,0	70,0	30,0

Хроматографічний аналіз.

Параметри хроматографічної системи:

Мобільна фаза А – 0,1 % розчин форміатної кислоти у воді;

Мобільна фаза В – 0,1 % розчин форміатної кислоти у метанолі.

Швидкість потоку – 0,6 мл/хв.

Об'єм зразка – 10 мкл.

Промивна рідина – метанол / вода 70 %/30 % (об./об.).

Температура колонки – 40 °С.

Час проведення розділення – 6 хв.

Розділення проводять за таким градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0.00	90	10
0.50	90	10
0.55	75	25
3.05	50	50
3.10	50	50
3.75	2	98
4.00	2	98
4.50	90	10
5.00	90	10

Час виходу енраміцину А – 3,30 хв; енраміцину В – 3,63 хв.

Параметри роботи мас-спектрометричного детектора.

Час інтегрування – 5 хв.

Іонне джерело – електророзпилювач (ESI).

Температура джерела (Source Temperature) – 150 °С.

Температура висушування (Desolvation Temperature) – 600 °С.

Газ зіткнення (Collision Gas) – аргон.

Тиск аргону – $3,8 \times 10^{-3}$ mbar.

Газ висушування (Desolvation Gas) – азот.

Потік газу висушування – 1000 L/hr

Газ розпилення (Nebulisation Gas) – азот.

Потік газу розпилення – 50 L/hr

Час сканування (Dwell) – 0,025 с.

Іонізація – ES+ (позитивна)

Режим сканування мас – MRM (режим моніторингу множинних реакцій) (табл. 2).

Таблиця 2

Параметри сканування мас (MRM) для УЕРХ-МС/МС визначення для визначення залишків енраміцину у м'ясі птиці

Аналіти	Прекурсор-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Продукт-іон, m/z	Енергія зіткнення (Collision), V
Енраміцин А	786,35	52	95,02	34
			122,07	56
			688,50	13
			1089,95	21
Енраміцин В	790,71	50	95,09	33
			122,13	60
			688,25	15
			1089,60	25

Визначення вмісту енраміцину (сумарно енраміцину А та енраміцину В) в досліджуваних зразках м'яса птиці (мкг/кг) проводили згідно з калібрувальними графіками, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати й обговорення. Як видно з рисунка 1, енраміцин складається з двох основних компонентів – енраміцину А та енраміцину В, які відрізняються на одну групу – CH_2 -. Оскільки їх молекулярні маси досить великі, – 2355 та 2369 г/моль, то відповідно, за умов позитивної іонізації ES^+ ці поліпептиди здатні утворювати дво-, три- та чотиризарядні молекулярні батьківські іони (прекурсор-іони) [1, 2, 10] (табл. 3).

Таблиця 3

Прекурсор-іони основних складових енраміцину, що утворюються в режимі іонізації ES^+

Аналіти	Прекурсор-іон	m/z
Енраміцин А	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	1179
	$[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$	786
	$[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$	590
Енраміцин В	$[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$	1185
	$[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$	791
	$[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$	593

Як правило, найінтенсивнішими в мас-спектрі поліпептидів є тризарядні іони $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ [10], тому для кількісного визначення залишків енраміцину ми використовували по чотири MS/MS переходи кожного з тризарядних батьківських іонів 789 m/z (енраміцин А) та 791 m/z (енраміцин В) (табл. 2).

Для визначення вмісту енраміцину (сумарно енраміцину А та енраміцину В) у м'язових тканинах птиці за основу нами було взято методику пробопідготовки зразків, описану у роботі Бойсона та ін. [1], оскільки вважаємо доречним використовувати іон-парний реагент, а саме – трифлуороцтову кислоту. Проте замість вносити цей реагент до мобільної фази, змінюючи звичний її склад, ми застосовували трифлуороцтову кислоту під час екстракції енраміцину з гомогенізованих зразків м'яса у системі «рідина-рідина», як пропонують автори. Для додаткової очистки екстракту застосовували ТФЕ на картриджах зі стаціонарною октадецильною фазою, які хоча і не є високоселективними, але забезпечують суттєву очистку екстракту від матричного впливу компонентів м'яса. Так, аналітичні сигнали від енраміцину А та енраміцину В (сумарна концентрація 10 нг/мл енраміцину), приготованих на мобільній фазі та зразок, підготовлений відповідно до процедури пробопідготовки на екстракті чистого зразка м'яса птиці, практично не відрізнялися за характером піку, абсолютними площами, співвідношенням «сигнал/шум» та співвідношенням іонів. Це свідчить про відсутність

пригнічення іонізації аналітів складовими матриці та підтверджує ефективність вибраної пробопідготовки для визначення залишків енраміцину.

На рис. 2 і 3 наведено калібрувальні графіки, побудовані на стандартних розчинах енраміцину, для його визначення в діапазоні концентрацій від 0 до 100 мкг/кг, тобто від 0 до 70,0 мкг/кг для енраміцину А (Рис. 2) та від 0 до 30,0 мкг/кг для енраміцину В (рис. 3).

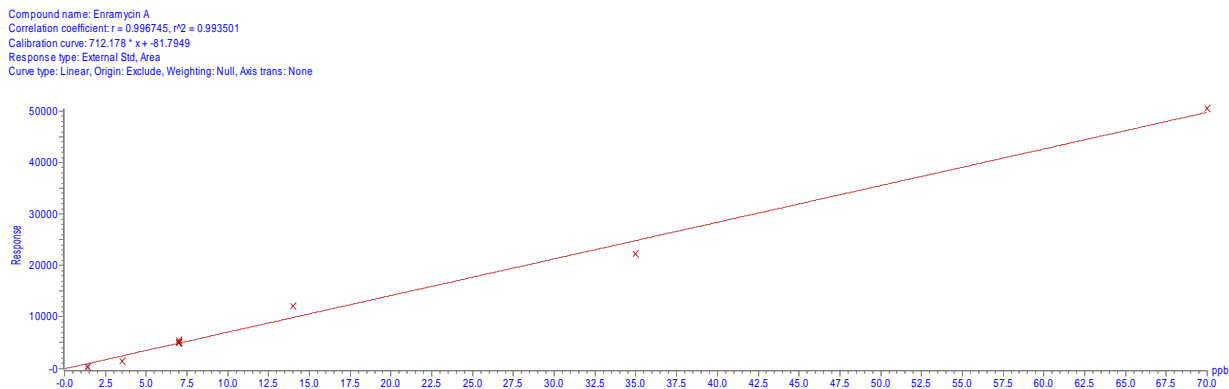


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення енраміцину А в діапазоні концентрацій 0-70,0 мкг/кг ($R^2=0,9935$).

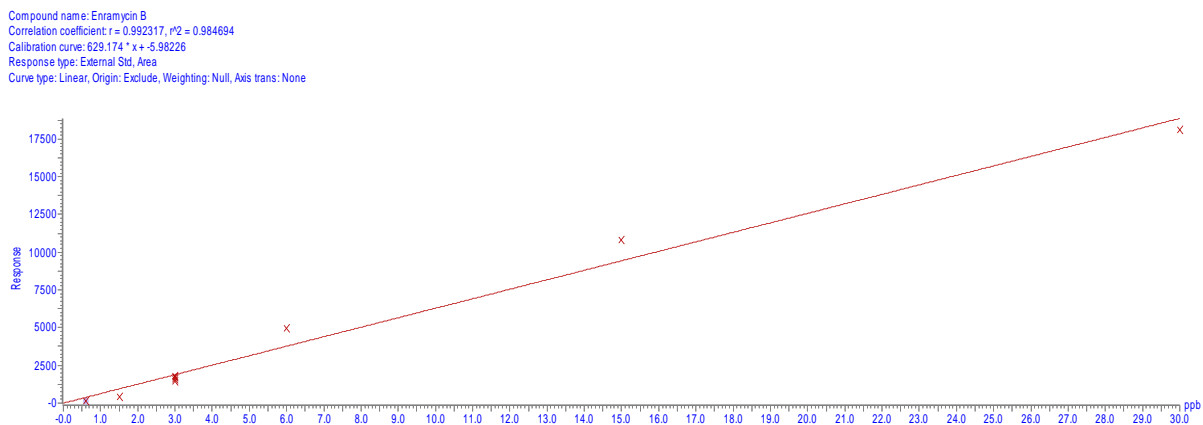


Рис. 3. Калібрувальний графік для визначення енраміцину В в діапазоні концентрацій 0-30,0 мкг/кг ($R^2=0,9846$).

Оцінку придатності запропонованої методики для аналізу зразків м'язових тканин курей проводили за критерієм “додано-отримано” з використанням контрольних (чистих) матриць. Результати представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

Метрологічні характеристики методики УЕРХ-МС/МС визначення енраміцину у м'язових тканинах курей

Аналіт	Навантажено 50 мкг/кг енраміцину	CV, %	Навантажено 100 мкг/кг енраміцину	CV, %
	одержано %		одержано %	
Енраміцин А	80	18	93	16
Енраміцин В	77	20	81	19

Згідно з отриманими даними, межа детектування енраміцину А при визначенні залишкових кількостей енраміцину у зразках м'язових тканинах курей, становить 5 мкг/кг, а межа кількісного визначення – 15 мкг/кг. Для визначення енраміцину В ці величини становлять 4 мкг/кг та 10 мкг/кг, відповідно. Отже, за чутливістю розроблена методика цілком конкурентна з попередньо опублікованими ВЕРХ-МС/МС методиками визначення поліпептидних антибіотиків у м'язах тварин.

Розроблену методику УЕРХ-МС/МС визначення залишків енраміцину у м'ясі птиці апробовано при аналізі реальних та навантажених зразків. На рисунку 4 представлено

хроматограми екстрактів відповідно підготованих чистих зразків м'язової тканини курчат та чистих зразків, навантажених енраміцином. Як видно з наведених даних, запропонований градієнт хроматографічного розділення дозволяє надійно відокремити сигнали аналітів від сигналів матричних компонентів та забезпечити високочутливий та експресний аналіз зразків на вміст залишків енраміцину (тривалість хроматографічного розділення – 6 хв) без додавання іон-парного реагента до мобільної фази.

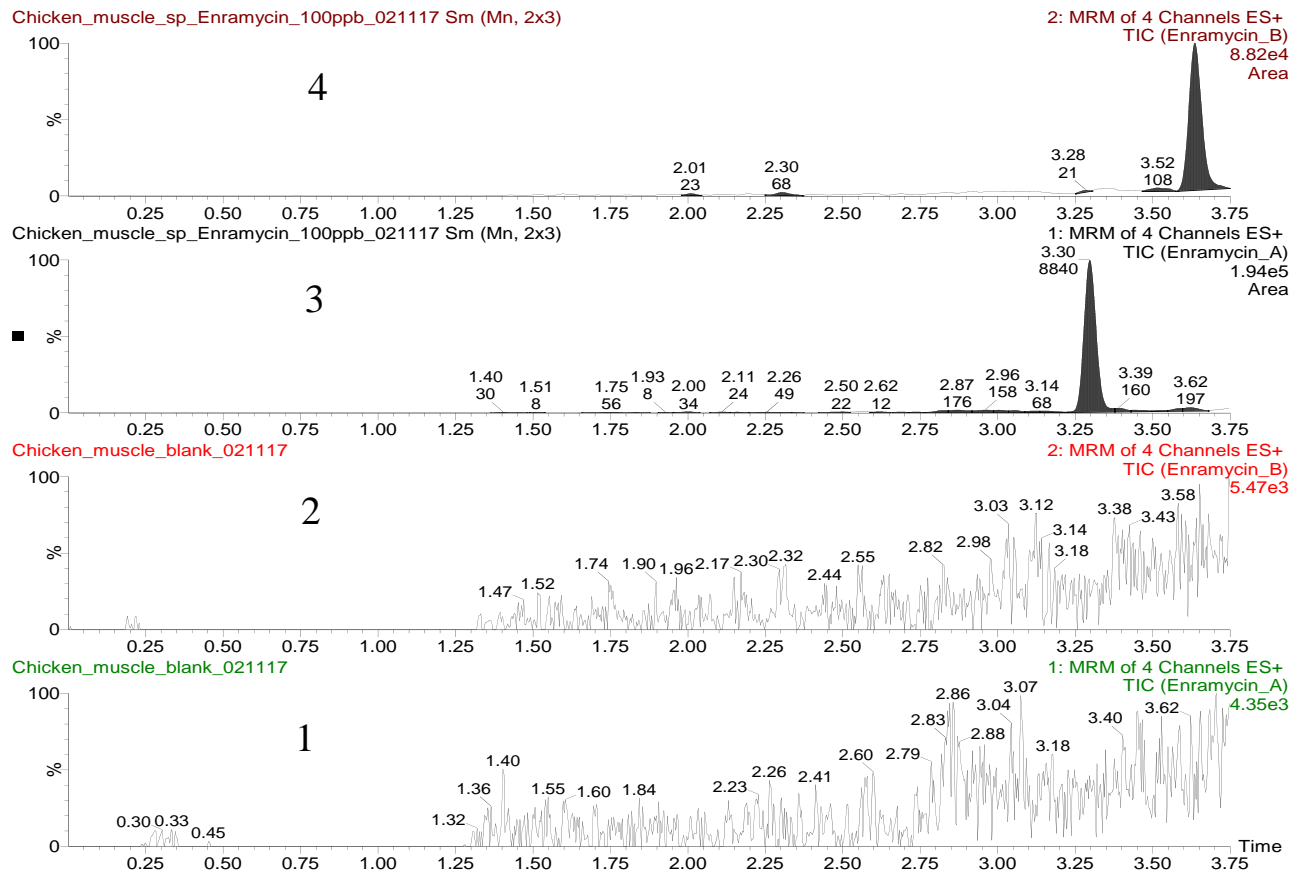


Рис. 4. Хроматограми екстрактів чистих зразків м'язової тканини курчат (1, 2) та чистих зразків, навантажених енраміцином на рівні 100 мкг/кг (3, 4).

Отже, за результатами проведених досліджень, розроблений та впроваджений підтверджуючий метод УЕРХ-МС/МС визначення залишкових кількостей поліпептидного антибіотика енраміцину є високоспецифічним та високочутливим, що дозволяє належним чином забезпечувати необхідний контроль експортних та імпорتنних партій м'яса птиці.

ВИСНОВКИ

Для контролю безпечності зразків м'яса птиці, а також зважаючи на проблему антибіотикорезистентності, нами розроблено та впроваджено підтверджуючий метод визначення залишкових кількостей поліпептидного антибіотика енраміцину високочутливим, високоселективним та експресним методом УЕРХ-МС/МС. Запропонована методика дозволяє на належному рівні проводити контроль та моніторинг безпечності зразків м'яса птиці, в тому числі, експортних партій, на вміст залишків енраміцину А та енраміцину В.

Перспективи досліджень. Модифікація процедури пробопідготовки зразків м'яса птиці для УЕРХ-МС/МС визначення залишкових кількостей енраміцину з метою покращення експресності та чутливості методики.

**THE DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR ENRAMYCIN RESIDUES
DETERMINATION IN POULTRY SAMPLES
USING ULTRA-EFFICIENT LIQUID CHROMATOGRAPHY
WITH TANDEM-MASS SPECTROMETRIC DETECTION**

D. Yanovych, Z. Zasadna, M. Rydchuk, S. Plotycya, A. Zayarnyuk

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine

S U M M A R Y

The manuscript presents the results of the development and introduction of UPLC-MS/MS method for the determination of residues of polypeptide antibiotic enramycin in chicken muscle tissues. Polypeptide antibiotics are often used in poultry for the treatment and prevention of various infectious diseases. Sometimes these drugs are added to feed at levels of sub-therapeutic concentrations as antimicrobial growth promoters, throughout the entire period of growth, which may cause the appearance of antibiotic-resistant strains of pathogenic bacteria and reduce the effectiveness of known antibiotics for human treatment. For this reason, growth promoters such as polypeptide antibiotics: bacitracin, colistin, virginamycin, enramycin, are prohibited for use as feed additives, in particular in the European Union. Since enramycin is banned in European countries, its maximum residue level is not legally established. However, in Japan and Korea, MRL for enramycin in chicken meat and offal is at the level of 30 µg/kg. Enramycin (enduracidine) is a polypeptide antibiotic consisting of 17 amino acids. It is produced by bacteria *Streptomyces fungicidicus*. Enramycin is effective against gram-positive bacteria; it has a growth promoting effect on pigs and chickens, including broilers. The main components of enramycin are enramycin A and enramycin B, which differ only on one –CH₂– group. Their ratio may vary, but predominantly enramycin A content is ~ 45-70 % and the enramycin B ~ 30 %. Very few methods had previously been published for the analysis of polypeptide residues, in particular, of enramycin, in food of animal origin. Therefore, due to the problem of antibiotic resistance, as well as the increased requirements to the safety control of food products of animal origin, in particular poultry, we have developed and introduced the method of simultaneous quantitative determination of enramycin A and enramycin B in chicken muscle tissues by rapid, highly sensitive and highly selective UPLC-MS/MS technique.

Sample preparation procedure consists of the homogenization of chicken muscles tissues, liquid-liquid extraction by means of aqueous and methanolic solutions of trifluoroacetic acid, purification by octadecyl cartridges for solid-phase extraction, samples concentration by means of evaporation, reconstitution in mobile phase and filtration. Since enramycin A and enramycin B have large molecular weights: 2355 and 2369 a.m.u., respectively, these polypeptides can form two-, three-, and four-charged molecular parent ions (precursor ions) in ionization mode ES⁺. Typically, three-charge ions [M + 3H]³⁺ are the most intensive in the mass spectrum of polypeptides, therefore, for quantification of enramycin residues we used four MS/MS transitions of each of three-charge parent ions: 786 m/z for enramycin A and 791 m/z for enramycin B (product ions were common for both analytes, viz. 95, 122, 688 and 1090 m/z). Reversed phase chromatographic separation was performed in gradient mode during 6 min using 0.1 % formic acid in water and 0.1 % formic acid in methanol as mobile phases. Determination of enramycin content (total enramycin A and enramycin B) in examined poultry meat samples was carried out using the calibration curves, built on enramycin standard solutions in the range of concentrations from 0 to 100 µg/kg, that is, from 0 to 70.0 µg/kg for enramycin A and from 0 to 30, 0 µg/kg for enramycin B according to the certificate of quality of enramycin standard.

The main advantages of the developed method are the rapid chromatographic separation, high selectivity and high sensitivity. The limit of detection of enramycin A is 5 µg/kg and enramycin B is 4 µg / kg, which competes with previously published UPLC-MS/MS methods for the determination of polypeptide antibiotics in animal tissues. The method has been approved in the analysis of real and fortified samples of poultry meat (CV ~ 20 %).

Keywords: POLYPEPTIDE ANTIBIOTICS, ENRAMYCIN, RESIDUES, UPLC-MS/MS, POULTRY MEAT.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ ЭНРАМИЦИНА В ОБРАЗЦАХ МЯСА ПТИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УЛЬТРАЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМ-МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Д. В. Яновыч, З. С. Засадна, М. В. Рыдчук, С. И. Плотьця, А. М. Заярнюк

Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье представлены результаты разработки и внедрения УЭЖХ-МС/МС метода для определения остатков полипептидного антибиотика энрамицина в мышечных тканях кур. Пробоподготовка образцов включает гомогенизацию, экстракцию в системе «жидкость-жидкость» с использованием водных и метанольных растворов трифлуороцетовой кислоты, очистку с помощью октадецильных картриджей для твердофазного экстрагирования, концентрирование, перерастворение в мобильной фазе и фильтрацию. Основными преимуществами разработанной методики являются экспрессность хроматографического разделения, высокая селективность и высокая чувствительность (предел обнаружения энрамицина А составляет 5 мкг/кг, а энрамицина В – 4 мкг/кг). Методика апробирована при анализе реальных и фортифицированных образцов мяса птицы (CV ~ 20 %).

Ключевые слова: ПОЛИПЕПТИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ, ЭНРАМИЦИН, ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА, УЭЖХ-МС/МС, МЯСО ПТИЦЫ.

Л И Т Е Р А Т У Р А

11. *Boison J. O.* A multi-residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC-MS/MS / J. O. Boison, S. Lee, J. Matus // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2015. – V. 407. – P. 4065–4078.

12. Polypeptide antibiotics in food control / A.-L. Drangmeister, F. Busch, S. Schittko, L. Hartig // *EuroResidue VIII. Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, 23-25 May 2016, Hotel Zuiderduin, Egmond an Zee, The Netherlands.* – 2016. – P. 168.

13. European Union Register of Feed Additives, pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, List of additives, released 20.12.2012.

14. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits, *Official Journal of the European Union (L15)*.

15. Engineered biosynthesis of enduracidin lipoglycopeptide antibiotics using the ramoplanin mannosyltransferase Ram29 / M.-C. Wu, M. Q. Styles, B. J. C. Law et al. // *Microbiology.* – 2015. – V. 161. – P. 1338–1347.

16. Enduracidin, a new antibiotic. I. *Streptomyces fungicidicus* No. B5477, an enduracidin producing organism / E. Higashiide, K. Hatano, M. Shibata, K. Nakazawa // *J. Antibiot.* – 1968. – V. 21. – P. 126–130.
17. Enduracididine, a rare amino acid component of peptide antibiotics: Natural products and synthesis / D. J. Atkinson, B. J. Naysmith, D. P. Furkert, M. A. Brimble // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2016. – V. 12. – P. 2325–2342.
18. Enduracidin Analogues with Altered Halogenation Patterns Produced by Genetically Engineered Strains of *Streptomyces fungicidicus* / X. Yin, Y. Chen, L. Zhang et al. // *J. Nat. Prod.* – 2010. – V. 73 (4). – P. 583–589.
19. Hori M. Enduracidin, a New Antibiotic. VI. Separation and Determination of Enduracidins A and B by Column Chromatography / M. Hori, N. Sugita, M. Miyazaki // *Chem. Pharm. Bull.* – 1973. – V. 21 (6). – P. 1171–1174.
20. An approach to on-line electrospray mass spectrometric detection of polypeptide antibiotics of enramycin for high-speed counter-current chromatographic separation / K. Inoue, Y. Hattori, T. Hino, H. Oka // *J. Pharm. Biomed. Analysis* – 2010. – V. 51. – P. 1154–1160.
21. Determination of enramycin in chicken and swine muscles by high performance liquid chromatography / M. Horie, Y. Hoshino, N. Nose et al. // *Food Hyg. Saf. Sci. Shokuhin Eiseigaku Zasshi Jpn* – 1985. – V. 26 (4). – P. 337–342.
22. Y. Ikai. Chemical analysis of peptide antibiotics. In: *Chemical analysis of antibiotics used in agriculture*. Edited by H. Oka, H. Nakazawa, K. Harada, J. D. MacNeil / AOAC International. – Arlington, VA, USA. – 1995. – PP. 407–437; 3201–3301.

Рецензент – Ю. М. Косенко, д. б. н., ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.