

УДК 637.07: 577.18: 543

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМФЕНИКОЛОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / КВАДРУПОЛЬ-ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

В.Г. Амелин¹, А.М. Мухрыгина¹, А.И. Коротков²

(Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и
Николая Григорьевича Столетовых: *e-mail: amelinvg@mail.ru)

Предложен простой способ пробоподготовки, идентификации и определения в пищевых продуктах амфениколов (хлорамфеникола, хлорамфеникола сукцината, тиамфеникола, тиамфеникола глицинат ацетилцистеината, флорфеникола, флорфениколамина) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения по точным массам образующихся в электроспрее ионов. Объекты анализа – мясо (говядина, свинина, птица), субпродукты, молоко и молочные продукты, мед, продукция аквакультуры. Проподготовка заключалась в экстракции целевых компонентов ацетонитрилом и разбавлении экстракта деионированной водой в два раза. Рассмотрены особенности определения амфениколов и их производных, связанные с появлением различных аддуктов в электрораспылительном устройстве при детектировании как положительных, так и отрицательных ионов. Предложен способ определения амфениколов методом добавок с использованием суммирования площадей сигналов всех зарегистрированных аддуктов. Показаны особенности и преимущества использования метода стандартных добавок. Диапазон определяемого содержания составил 0,1–10 нг/г для хлорамфеникола и 1–100 нг/г для тиамфеникола и флорфеникола. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышало 0,1; продолжительность анализа 30–40 мин.

Ключевые слова: амфениколы и их производные, хлорамфеникол, тиамфеникол, флорфеникол, флорфениколамин, высокоэффективная жидкостная хроматография / квадруполь-времяпролетная масс-спектрометрия высокого разрешения, анализ пищевых продуктов.

Амфениколы – группа химических соединений с антибактериальной активностью, включающая хлорамфеникол (ХАФ), тиамфеникол (ТАФ), флорфеникол (ФФ) и их производные (рис. 1).

Амфениколы используют как в медицине, так и в ветеринарии. Первое соединение в этом классе (ХАФ) выделено в 1947 г. из культуральной жидкости актиномицета *Streptomyces venezuelae*. Широкое использование ХАФ в ветеринарии привело к появлению в продуктах питания (мясо, молоко, мед, рыбопродукты и пр.) этого вещества, оказывающего токсическое действие на организм человека. В связи с этим использование ХАФ было запрещено для лече-

ния сельскохозяйственных животных и птицы в США (1984 г.) и в ЕС (1994 г.) [1]. В Российской Федерации данный препарат разрешено использовать, но при условии его отсутствия в пищевых продуктах. Однако очень часто ХАФ используют нелегально, что приводит к появлению его в молоке и молочных продуктах, мясе, меде, мясе птицы и рыбопродуктах. В настоящее время максимально допустимый уровень (МДУ) ХАФ в пищевых продуктах установлен на уровне 0,3 нг/г в странах ЕС и Таможенного Союза. Менее токсичны ТАФ и ФФ, для которых МДУ остаточных количеств в пищевых продуктах составляет 50 нг/г (ТАФ) и 1–3 мкг/г (сумма ФФ с его основным метаболитом флорфенико-

¹ Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых и Федеральный центр охраны здоровья животных.

² Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых и Брянская межобластная ветеринарная лаборатория.

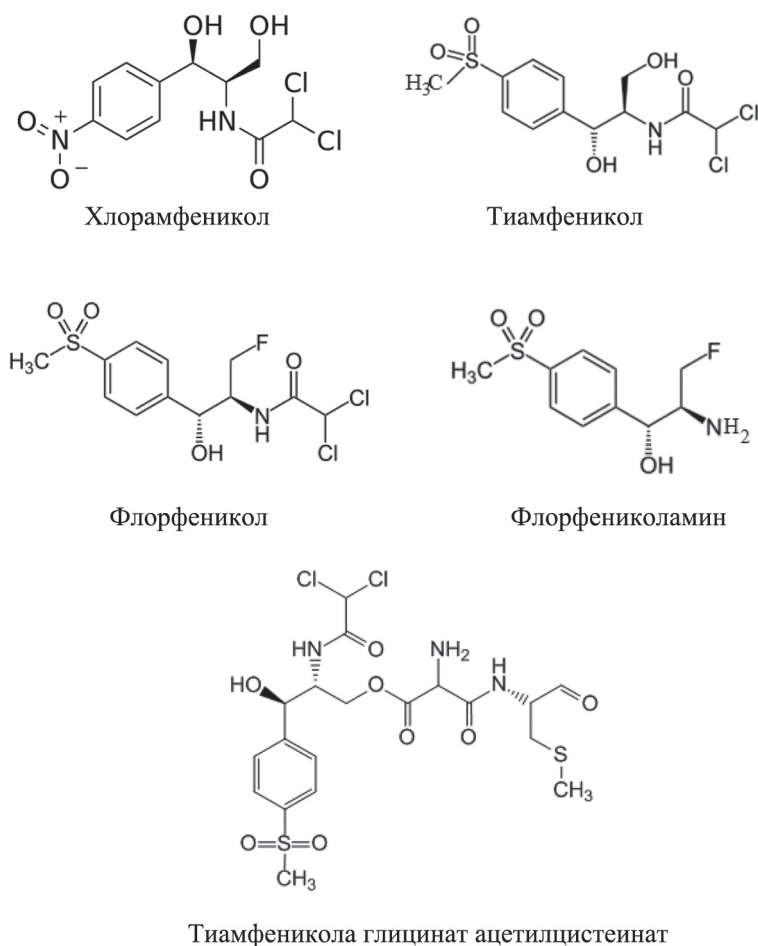


Рис. 1. Структурные формулы амфениколов и их производных

ламином (ФФА)) [2, 3]. Следует отметить, что вместо основных препаратов часто используют хлорамфеникола сукцинат, пальмитат, стеарат и тиамфеникола глицинат ацетилцистеинат (комбинированный препарат). Установлено, что в организме животного и человека производные хлорамфеникола разлагаются до хлорамфеникола [4], а производные тиамфеникола – до тиамфеникола и ацетилцистеината (последний обладает муколитическим действием). Анализ большого числа проб пищевых продуктов по разработанной методике показал присутствие в некоторых из них сукцината хлорамфеникола. В действующем ГОСТ [5] для определения хлорамфеникола присутствие его эфира не учитывается, что может привести к значительным погрешностям в анализе. Однако нам не удалось установить, поступает это вещество в пищевые продукты из организма животного или при обработке продукта.

Цель данной работы – выявление особенностей определения амфениколов и их производных в пищевых продуктах методом высоко-

эффективной жидкостной хроматографии / квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрии высокого разрешения и способы определения амфениколов с учетом этих особенностей.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Использовали жидкостной хроматограф «UltiMate 3000» («Thermo Scientific», США) в сочетании с квадруполь-времяпролетными масс-спектрометрическими детекторами «maXis Impact» и «maXis 4G» («Bruker Daltonics», Германия). Разделение проводили на колонке (150×2,1 мм) Acclaim™ 120 C18 (2,2 мкм) («Thermo Scientific», США) в режиме градиентного элюирования.

Реактивы. Использовали стандартные образцы хлорамфеникола и хлорамфеникола сукцината натриевую соль, тиамфеникола, флорфеникола, флорфениколамина («Sigma-Aldrich», США), тиамфеникола глицината ацетилцистеинат (Флуимуцил антибиотик ИТ, «Zambon», Италия). Растворы концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением соответствующих на-

весок в ацетонитриле. Для приготовления рабочих растворов исходные разбавляли деионированной водой (15–18 МОм/см, ТУ 2123-002-00213546-2004). Использовали ацетонитрил, метанол, муравьиную кислоту, изопропанол («Merck», Германия).

Условия хроматографического разделения и детектирования. Использовали подвижные фазы, состоящие из 0,1%-й муравьиной кислоты в воде с добавлением 5 мМ формиата аммония (А) и 0,1%-й муравьиной кислоты в ацетонитриле (В) и градиентное элюирование в следующем режиме: 0 мин – 2% В, 15 мин – 100% В, 20 мин – 100% В, 30 мин – 2% В. Скорость потока подвижной фазы 0,3 мл/мин. Оптимальная температура хроматографической колонки 35 °С, объем вводимой пробы 20 мкл. Использовали электрораспылительную ионизацию в устройстве «ionBooster» («Bruker Daltonics», Германия). Установлены следующие оптимальные значения параметров: напряжение на щите капилляра и на капилляре соответственно 400 и 1000 В, давление газа-распылителя (азота) 4,76 атм, скорость потока газа-осушителя (азота) 6 л/мин, температура газа-осушителя (азота) 200 °С, скорость потока газа-испарителя (азота) 250 л/ч, температура газа-испарителя (азота) 250 °С. Выбор оптимальных условий описан в работе [6].

Диапазон регистрируемых значений массы ионов 200–500 Да. Ширина окна регистрации извлеченной массы ионов составляла $\pm 0,002$ Да. В качестве калибранта использовали формиат натрия (10 мМ) в водном растворе изопропанола (1:1). Градуировку масс-спектрометра проводили в автоматическом режиме при записи хроматограммы от 3 до 4 мин в режиме регистрации положительных ионов и от 16 до 17 мин в режиме регистрации отрицательных ионов.

Пробоподготовка. Оптимальные условия пробоподготовки (по минимальному матричному эффекту) были выбраны из серии экспериментов с пробами разной массы (1, 2 и 5 г), фиксированным объемом экстрагента (4 мл ацетонитрила + 1 мл воды или 5 мл ацетонитрила) и при разной кратности разбавления экстракта деионированной водой (в 2, 3 и 5 раз). В итоге был выбран следующий вариант пробоподготовки. В центрифужную пробирку емкостью 15 мл помещали 1,00 г измельченного и тщательно усредненного образца (мясо, молоко, печень, почки, яйца, рыба и мед), добавляли 4 мл ацетонитрила и 1 мл деионированной воды (для молока 5 мл ацетонитрила), а также 0,1 мл НСООН. Встряхивали в течение 5 мин, обраба-

тывали ультразвуком 5 мин, а затем центрифугировали 10 мин (5000 об/мин, –4 °С). Далее отбирали 1 мл полученного экстракта в флакон емкостью 5 мл, добавляли 1 мл деионированной воды, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр (0,45 мкм) в микрофлакон и хроматографировали.

Идентификация и определение. Для идентификации амфениколов полученные хроматограммы обрабатывали с помощью программного продукта DataAnalysis-4.1, TargetAnalysis («Bruker Daltonics», Германия). Для составления картины изотопного распределения аналитов использовали программу IsotopePattern («Bruker Daltonics», Германия). Концентрацию аналитов в пробе определяли методом стандартной добавки и рассчитывали по формуле:

$$c_x = c_{\text{доб}} / (S_{x+\text{доб}} / S_x - 1),$$

где c_x , $c_{\text{доб}}$ – концентрация аналита без добавки и с добавкой, нг/г, S_x , $S_{x+\text{доб}}$ – площадь хроматографических пиков без добавки и с добавкой аналита.

Результаты и их обсуждение

В данной работе использовали оптимальные условия хроматографического разделения и одновременного определения в пищевых продуктах 492 органических токсикантов, в том числе и амфениколов [7]. Мы не пытались создавать оптимальные условия определения отдельно для амфениколов, а решили выявить особенности их поведения в данных условиях и с учетом этих особенностей установить оптимальный вариант определения.

Хлорамфеникол. Установлено, что в условиях электрораспылительной ионизации хлорамфеникол образует как протонированные $[M+H]^+$, так и депротонированные $[M-H]^-$ ионы, а также ионы $[M+NH_3+HCOO]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+CF_3COO]^-$ при времени удерживания 9,8 мин. Чувствительность определения ХАФ при регистрации положительных ионов в 10 раз ниже, чем при регистрации отрицательных ионов (табл. 1).

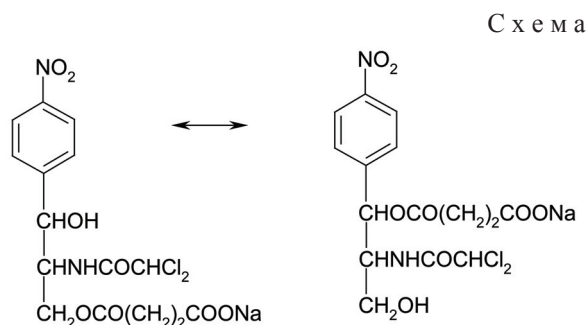
Часто используемое производное ХАФ – хлорамфеникола сукцинат натриевая соль (ХАФС), как известно [4], представлено двумя формами, находящимися в равновесии ХАФС-1 и ХАФС-3 (схема).

На рис. 2 представлены масс-хроматограммы стандартного раствора ХАФС. Из рис. 2, а следует, что в стандартном растворе ХАФС присутствуют ХАФС-1 и ХАФС-3, время удерживания 10,1 и 10,6 мин соответственно ($m/z = 421,0200$).

Таблица 1

Хромато-масс-спектрометрические характеристики амфениколов

Аналит	Брутто-формула	Ион	t_R , мин	m/z	Δ , млн ⁻¹	$C_{минр}$ нг/мл	$C_{пр}$ нг/мл
Тиамфеникол	$C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$	$[M+H]^+$	7,9	356,0121	-1,0	1	4
		$[M+NH_4]^+$	7,9	373,0386	0,9	0,1	0,4
		$[M+K]^+$	7,9	393,9685	0,8	0,1	0,4
		$[M-H_2O+H]^+$	7,9	338,0016	0,7	0,1	0,4
		$[M-H]^-$	7,9	353,9964	1,0	0,1	0,4
		$[M+Cl]^-$	7,9	391,9703	0,8	0,1	0,4
		$[M+CF_3COO]^-$	7,9	467,9893	0,7	0,1	0,4
Флорфеникол	$C_{12}H_{14}NO_4Cl_2SF$	$[M+H]^+$	9,5	358,0077	-1,1	1	4
		$[M+NH_4]^+$	9,5	375,0343	1,1	0,1	0,4
		$[M+K]^+$	9,5	395,9636	0,8	0,1	0,4
		$[M-H]^-$	9,5	355,9921	1,0	0,1	0,4
		$[M+Cl]^-$	9,5	391,9688	0,9	0,1	0,4
		$[M+CF_3COO]^-$	9,5	469,9880	0,8	0,5	2,0
Флорфеникол амин	$C_{10}H_{14}NO_3SF$	$[M+H]^+$	3,2	248,0751	-1,0	0,001	0,005
		$[M-H_2O+H]^+$	3,2	230,0650	0,9	0,001	0,005
Тиамфеникол глицината ацетилцистеинат	$C_{19}H_{25}N_3O_8Cl_2S_2$	$[M-C_5H_7NO_2S+H]^+$	6,8; 6,4	413,0336	0,9	0,1	0,4
		$[M-C_7H_{10}N_2O_2S+H]^+$	7,9; 6,8; 6,4	356,0121	1,0	1	4
		$[M-C_7H_{10}N_2O_2S+NH_4]^+$	7,9; 6,8; 6,4	373,0386	0,8	0,1	0,4
		$[M-C_5H_7NO_2S-H]^-$	6,8; 6,4	411,0195	1,3	0,5	2,0
		$[M-C_7H_{10}N_2O_2S-H]^-$	7,9; 6,8; 6,4	353,9964	1,4	2	7
		$[M-C_7H_{10}N_2O_2S+Cl]^-$	7,9; 6,8; 6,4	391,9703	0,8	5	20
		$[M-C_7H_{10}N_2O_2S+CF_3COO]^-$	7,9; 6,8; 6,4	467,9893	1,3	4	12
		$[M-H]^-$	4,3	162,0219	0,8	3	10
Апетилцистеин	$C_5H_9NO_3S$	$[M+H]^+$	9,8	323,0196	0,8	0,2	0,7
		$[M-H]^-$	9,8	321,0039	1,1	0,02	0,05
		$[M+NH_3+HCOO]^-$	9,8	384,0360	1,6	0,03	0,08
		$[M+Cl]^-$	9,8	356,9806	0,9	0,03	0,08
		$[M+CF_3COO]^-$	9,8	434,9968	1,1	0,03	0,08
Хлорамфеникол	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	$[M-C_4H_4O_3Na]^-$	9,8; 10,1, 10,6;	321,0039	1,5	0,01	0,03
		$[M-C_4H_4O_3Na+Cl]^-$	9,8	356,9806	0,9	0,05	0,2
		$[M-C_4H_4O_3Na+CF_3COO]^-$	9,8	434,9968	0,8	0,02	0,06
		$[M-Na]^-$	10,1, 10,6	421,0200	1,0	0,01	0,03
Хлорамфеникола сукцинат	$C_{15}H_{15}Cl_2N_2O_8Na$	$[M-C_4H_4O_3Na]^-$	9,8; 10,1, 10,6;	321,0039	1,5	0,01	0,03
		$[M-C_4H_4O_3Na+Cl]^-$	9,8	356,9806	0,9	0,05	0,2



Кроме того, на масс-хроматограмме ХАФС с $m/z = 321,0039$ зарегистрированы три пика при 9,8; 10,1 и 10,6 мин, соответствующие ХАФ (рис. 2, б). Это свидетельствует о частичном разложении ХАФС до ХАФ как в процессе электрораспылительной ионизации, так и вне его. При времени удерживания 9,8 мин присутству-

ют четыре аддукта $[M+CF_3COO]^-$ (1), $[M+Cl]^-$ (2), $[M+NH_3+HCOO]^-$ (3) и $[M-H]^-$ (4), что подтверждает присутствие ХАФ уже в процессе приготовления стандарта ХАФС (рис. 2, б).

Установлено, что многие пищевые продукты (молоко, сыр, творог, мед и др.) на момент анализа содержали остаточные количества ХАФС.

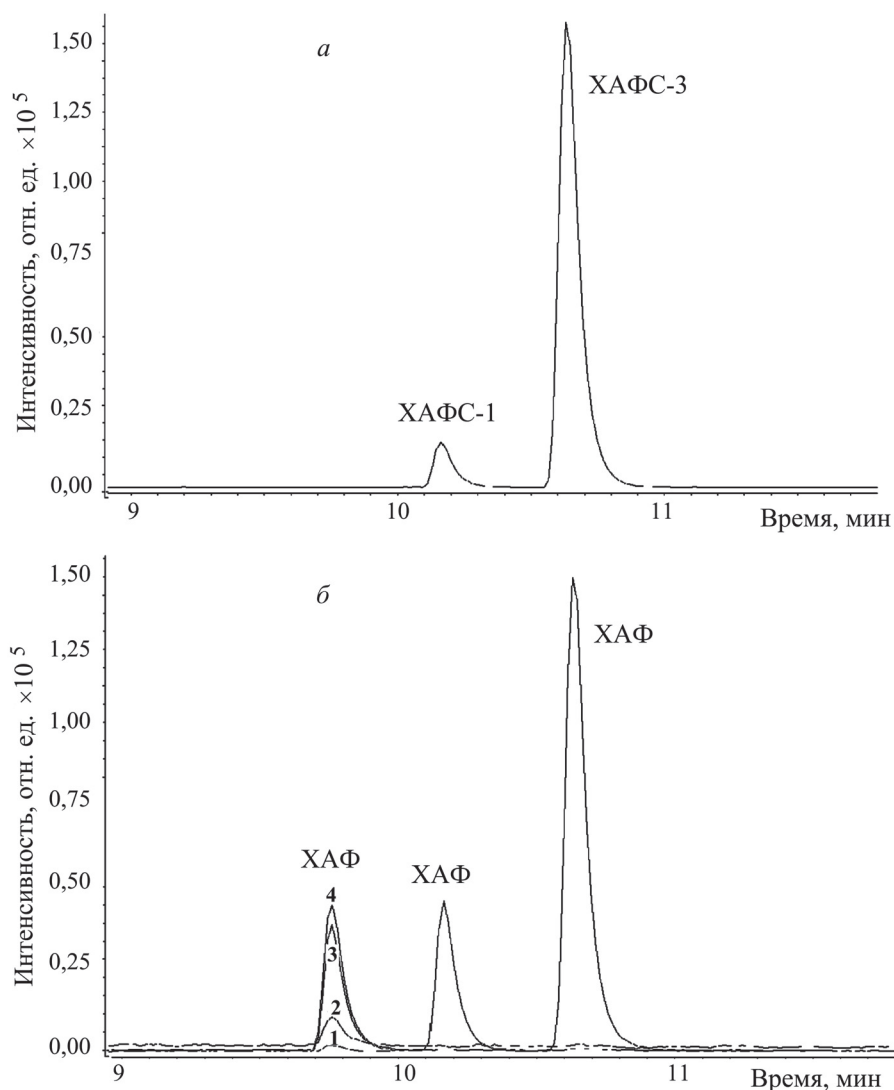


Рис. 2. Масс-хроматограммы стандартного раствора (100 нг/мл) ХАФС $m/z = 421,0200$ (а) и $m/z = 321,0039$ (б). Аддукты $[M+CF_3COO]^-$ (1), $[M+Cl]^-$ (2), $[M+NH_3+HCOO]^-$ (3) и $[M-H]^-$ (4)

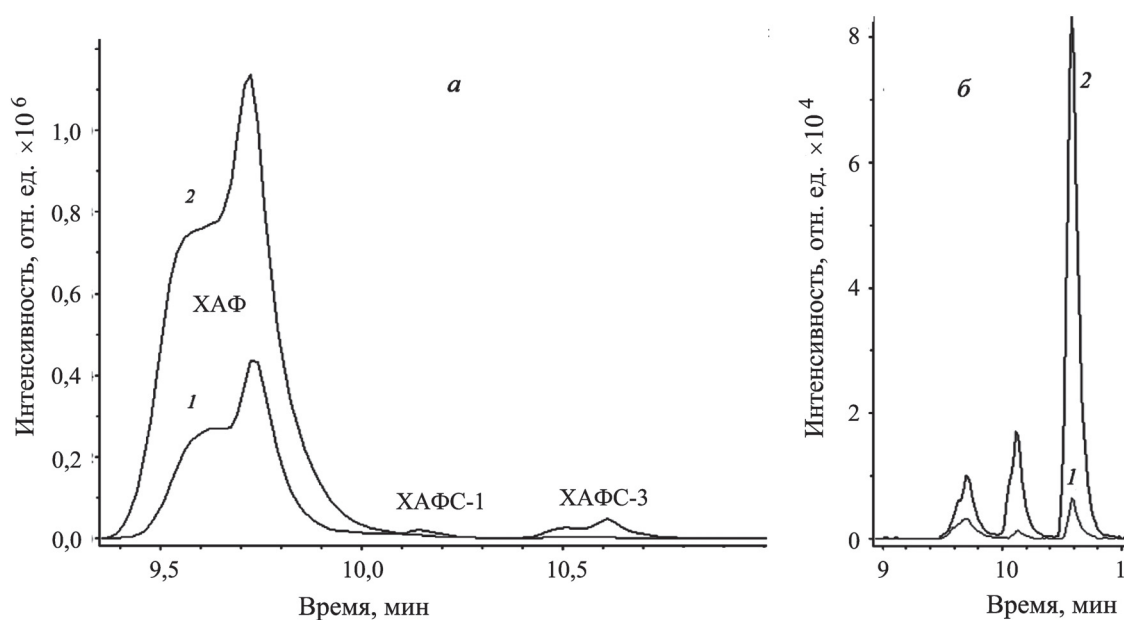


Рис. 3. Масс-хроматограммы экстрактов из творога (а) без добавки (1) и с добавкой 1 нг/г ХАФ (2) и куриного яйца (б) без добавки (1) и с добавкой ХАФС (2) ($m/z = 321,0039$)

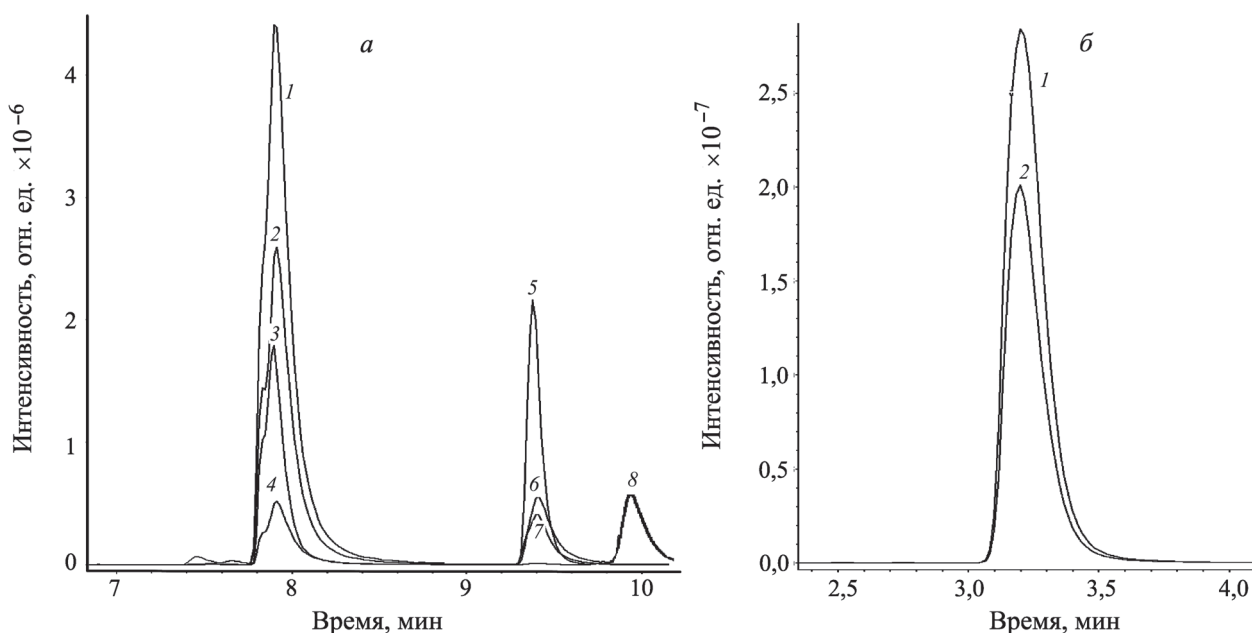


Рис. 4. Масс-хроматограммы положительных ионов (а) для стандартных растворов тиамфеникола (1 – $[M+NH_4]^+$, 2 – $[M+H]^+$, 3 – $[M+K]^+$, 4 – $[M-H_2O+H]^+$), флорфеникола (5 – $[M+NH_4]^+$, 6 – $[M+H]^+$, 7 – $[M+K]^+$) и хлорамфеникола (8 – $[M+H]^+$); (б) флорфениколамина (1 – $[M+H]^+$, 2 – $[M-H_2O+H]^+$); $c_{ХАФ} = 10$ нг/мл, $c_{ФФА} = 5$ нг/мл

В качестве примера это иллюстрируют масс-хроматограммы экстрактов из творога и куриного яйца (рис. 3).

Следует отметить, что остаточные количества производных хлорамфеникола в пищевых продуктах оказывают также негативное влияние на здоровье человека, превращаясь в его организме в хлорамфеникол [4]. В данной работе предлагается определять остаточные количе-

ства ХАФ в пищевых продуктах методом стандартных добавок и путем суммирования площадей хроматографических пиков всех форм: ХАФ, ХАФС-1 и ХАФС-3 при $m/z = 321,0039$ и $m/z = 421,0200$. Использование данного приема позволило нам установить, что во многих проанализированных пищевых продуктах содержание остаточных количеств ХАФ с учетом и без учета ХАФС составило 2–50 и 0–2 нг/г

соответственно. Представленные данные свидетельствуют о том, что при определении ХАФ по существующим методикам возникают зна-

чительные погрешности, не учитывающие присутствия потенциально возможного токсиканта ХАФС в пищевых продуктах.

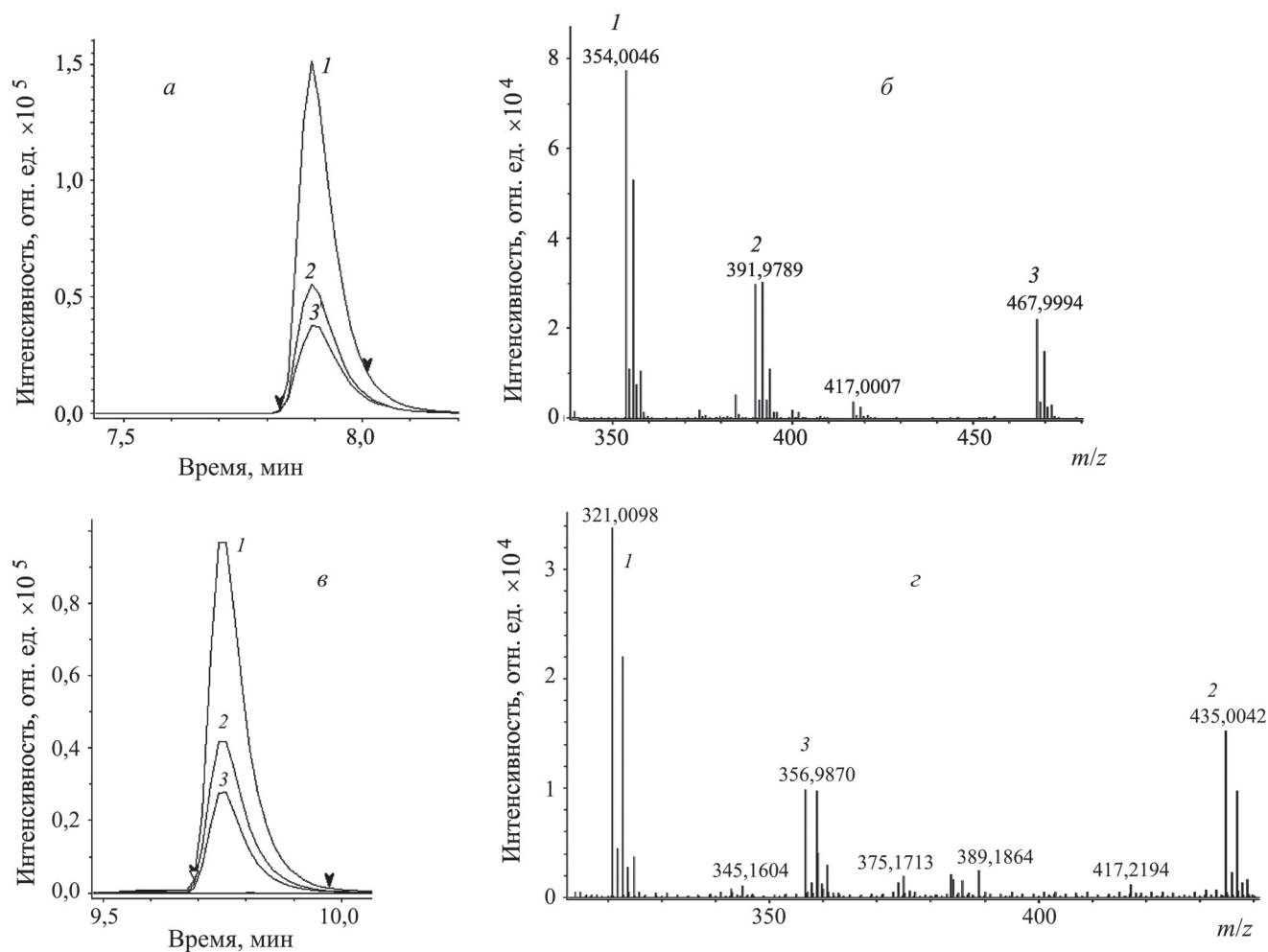


Рис. 5. Масс-хроматограммы (а, в) и масс-спектры (б, г) отрицательных ионов для стандартных растворов тиамфеникола (а, б: 1 – $[M-H]^-$, 2 – $[M+Cl]^-$, 3 – $[M+CF_3COO]^-$) и хлорамфеникола (в, г: 1 – $[M-H]^-$, 2 – $[M+CF_3COO]^-$, 3 – $[M+Cl]^-$)

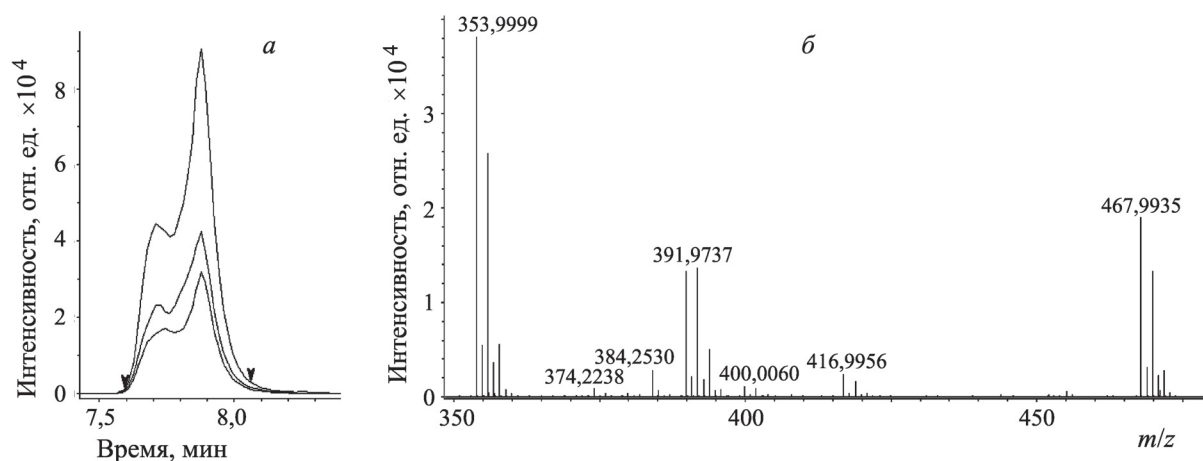


Рис. 6. Масс-хроматограмма (а) и масс-спектр (б) тиамфеникола из экстракта мяса курицы

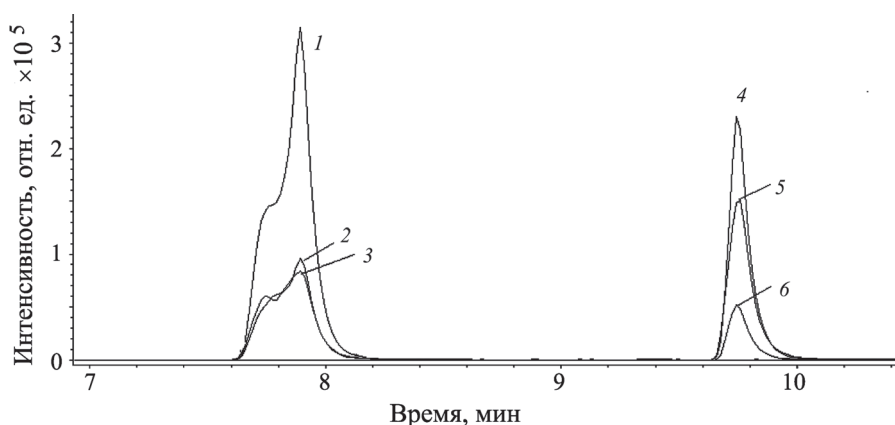


Рис. 7. Масс-хроматограмма экстракта из говядины: тиамфеникол – извлеченные массы m/z ионов $[M-H]^-$ 353,9964 (1), $[M+CF_3COO]^-$ 467,9893 (2), $[M+Cl]^-$ 391,9703 (3); хлорамфеникол – извлеченные массы m/z ионов $[M-H]^-$ 321,0039 (4), $[M+CF_3COO]^-$ 434,9968 (5), $[M+Cl]^-$ 356,9806 (6)

На рис. 3, а приведены масс-хроматограммы экстрактов из творога без добавления и с добавлением ХАФ. Хроматографические пики ХАФ в этих условиях имеют несимметричную форму (появление «плеча»), связанную, вероятно, с проявлением изомерных форм (все исследуемые аналиты имеют асимметричный атом углерода, рис. 1). Несимметричные хроматографические пики наблюдались нами также во всех формах ХАФС. В существующих методиках определения ХАФ данное обстоятельство не учитывается (предполагается наличие симметричного хроматографического пика и интегрирование проводится без учета «плеча»), что приводит к погрешностям в анализе. В нашем случае применение метода стандартной добавки нивелирует данную погрешность путем измерения и ис-

пользования в расчетах площадей несимметричных хроматографических пиков без добавки и с добавкой аналита.

Тиамфеникол. ТАФ также отличается большим разнообразием образующихся как положительных, так и отрицательных ионов с временем удерживания 7,9 мин (табл. 1). Здесь присутствуют аддукты с ионами водорода, аммония, калия и протонированные ионы с отщеплением воды. При регистрации отрицательных ионов наблюдали депротонирование, присоединение хлорид-иона и трифторацетат-иона (рис. 4). Следует отметить, что предел обнаружения, найденный по соотношению сигнал/шум, равному 3, составил 0,1 нг/мл как для положительных, так и для отрицательных ионов. Комбинированный препарат (тиамфеникола

Таблица 2

Результаты определения остаточных количеств ХАФ, ТАФ и ХАФС в пищевых продуктах (n = 3, P = 0,95)

Матрица	Аналит	Найдено, нг/г	s_r
Молоко	ХАФ	4,1 ± 0,3	0,07
Мед	ХАФС	0,8 ± 0,1	0,1
	ХАФ	3,2 ± 0,3	0,08
Яйцо куриное	ХАФ	2,3 ± 0,3	0,09
	ХАФС	1,3 ± 0,5	0,1
Печень свиная	ХАФ	2,8 ± 0,2	0,09
Творог	ХАФ	0,9 ± 0,1	0,1
	ХАФС	20,3 ± 0,5	0,05
Говядина	ХАФ	0,53 ± 0,05	0,07
	ТАФ	1,21 ± 0,09	0,09
Мясо курицы	ТАФ	1,55 ± 0,09	0,08

Т а б л и ц а 3

Результаты анализа референтного образца FAPAS-02272 (молоко коровье)

Аналит	Содержание по данным FAPAS (x_a), нг/г	Найдено предлагаемым способом (x), нг/г	z^*
ХАФ	0,336	0,4	0,9
ТАФ	19,5	21	0,4

* $z = (x - x_a) / s$, где x – найденная концентрация, x_a – приписанное значение концентрации, s – стандартное отклонение приписанного значения.

глицинат ацетилцистеинат) в процессе приготовления стандартных растворов и в условиях электрораспылительной ионизации распадается до тиамфеникола глицината с отщеплением ацетилцистеина ($M-C_5H_7NO_2S$; $t_R = 6,4; 6,8$ мин) и до тиамфеникола с отщеплением глицината ацетилцистеината ($M-C_7H_{10}N_2O_2S$; $t_R = 6,4; 6,8$ и $7,9$ мин). Указанные формы образуют также аддукты с ионами водорода, аммония, хлорид-ионами и трифторацетат-ионами (табл. 1).

На рис. 5 показаны масс-хроматограммы и масс-спектры стандартных растворов тиамфеникола и хлорамфеникола, а на рис. 6 – масс-хроматограммы тиамфеникола для экстракта из мяса курицы. Как и в случае хлорамфеникола, для реальных объектов появляются пики с «плечом», что еще раз доказывает необходимость использования метода добавок для нивелирования погрешностей при определении концентрации данных аналитов.

Флорфеникол. ФФ образует как положительно заряженные ионы (аддукты с ионами водорода, аммония и калия), так и отрицательные (с ионами водорода, хлорид- и трифторацетат-ионами) (рис. 4). Метаболит флорфеникола (флорфениколамин) образует только протонированные формы и формы с отщеплением воды (рис. 4, табл. 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pietroni W. J., Woźniak A., Pasik K., Cybulski W., Krasucka D. // Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2014. Vol. 58. P. 621.
2. Official Journal of European Union, L71 of 13 March 2003, Commission decision amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of MRPLs for certain residues in food of animal origin, Brussels, Belgium, 2003.
3. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 09.10.2013 N 68 о техническом регламенте Таможенного союза о безопасности мяса и мясной продукции.
4. Meissner H.C., Smith A.L. // Pediatrics. 1979. Vol. 64. N 3. P. 348.
5. ГОСТ Р 54904-2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. М., 2013.
6. Амелин В.Г., Федина Н.М., Коротков А.И. // Масс-спектрометрия. 2016. Т. 13. № 2. С. 5.
7. Amelin V., Korotkov A., Andoralov A. // J. AOAC Int. 2016. Vol. 99. N 6. P. 1600.

Анализ реальных проб. Проанализировано большое количество проб пищевых продуктов на содержание остаточных количеств амфениколов. При выбранном способе пробоподготовки диапазон определяемых значений содержания хлорамфеникола составил 0,1–10 нг/г, а для ТАФ, ФФ и ФФА диапазон составил 1–100 нг/г. Установлено одновременное присутствие хлорамфеникола и тиамфеникола в говядине (рис. 7, табл. 2), присутствие тиамфеникола в мясе курицы (рис. 6). Для подтверждения правильности идентификации и определения предлагаемым способом использовали референтные образцы для сличительных испытаний при проверке компетенции лабораторий Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS). Как видно из табл. 3, наблюдается удовлетворительное совпадение результатов анализа ($-2 \leq z \leq 2$), относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,1, продолжительность анализа 30–40 мин.

Таким образом, в данной работе показаны особенности определения амфениколов в пищевых продуктах и особенности, связанные с разнообразием образующихся в электроспрее аддуктов, а также показаны условия устранения возникающих проблем при определении амфениколов.

SPECIFIC FEATURES OF DETERMINING AMPHENICOLS IN FOODSTUFFS BY HPLC / HIGH RESOLUTION QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY

V.G. Amelin*, A.M. Mukhrygina, A.I. Korotkov

*(Vladimir State University named A.G. and N.G. Stoletovs; *e-mail: amelinvg@mail.ru)*

A simple method of sample preparation, identification and determination of amphenicols in foodstuffs (chloramphenicol, chloramphenicol succinate, thiamphenicol, thiamphenicol glycinate acetylcysteinate, florfenicol, florfenicol amine) by method of high-performance liquid chromatography / high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry by exact masses of ions formed in electrospray is suggested. Objects of analysis are meat (beef, pork, poultry), meat by-products, milk and dairy products, honey, aquaculture products. Sample preparation consisted in extraction of the target components by acetonitrile and the extract's dilution of deionized water twice. The specific features of determining amphenicols and their derivatives, associated with the emergence of various adducts in the electrospray device when detecting of both positive and negative ions were considered. A method of amphenicols determination was proposed by the addition method using the summation of areas signals of all registered adducts. The features and benefits of utilizing the method of standard additions were presented. Ranges of defined contents is 0.1–10 ng/g for chloramphenicol and 1–100 ng/g for thiamphenicol and florfenicol. The relative standard deviation of the test results did not exceed 0.1, the duration of the analysis was 30–40 minutes.

Key words: amphenicols and their derivatives, chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, florfenicol amine, high-performance liquid chromatography / high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry, food analysis.

Сведения об авторах: *Амелин Василий Григорьевич* – профессор кафедры химии Владимирского государственного университета имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, Федеральный центр охраны здоровья животных, докт. хим. наук (amelinvg@mail.ru); *Мухрыгина Александра Михайловна* – аспирант Владимирского государственного университета имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, Федеральный центр охраны здоровья животных (amukhrygina@bk.ru); *Коротков Антон Игоревич* – аспирант Владимирского государственного университета имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, Брянская межобластная ветеринарная лаборатория (antonio-ii@ya.ru).