

УДК 614.31:637.5

DOI: 10.46548/21vek-2020-0952-0020

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ-МС/МС ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНОГО КОЛИЧЕСТВА МЕТАБОЛИТОВ НИТРОФУРАНОВ В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

©2020

Чаплыгина Ольга Сергеевна, аспирант

Подлегаева Татьяна Викторовна, кандидат технических наук,

доцент кафедры «Технология и организация общественного питания»

Остроумов Лев Александрович, доктор технических наук, профессор,

главный научный сотрудник НИИ биотехнологии

Голубцова Юлия Владимировна, доктор технических наук, профессор,

заведующая кафедрой «Технология и организация общественного питания»

Кемеровский государственный университет

(650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,

e-mails: chaplygina_95@mail.ru, tpodlegaeva@yandex.ru, ula.gol@mail.ru)

Аннотация. Пищевые продукты животного происхождения в настоящее время нередко представляют собой опасность для жизни и здоровья населения в силу содержания различных пищевых и лекарственных добавок, используемых как на этапе выращивания животного, так и на этапе производства и хранения продукции. Одним из таких элементов в мясной продукции могут являться антибиотики различных классов, используемые в животноводстве и ветеринарии в качестве стимуляторов роста или для профилактики и лечения ряда заболеваний. Важной задачей производства стоит не допускать такого рода продукцию для употребления, как в виде самостоятельного продукта, так и в качестве сырья. Для решения подобных задач необходимы точные и эффективные методики определения антибиотиков в пищевых продуктах. В работе рассмотрена возможность применения методики высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором к анализу мясного сырья на остаточное количество метаболитов нитрофуранов - 3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ), 1-амино-гидантоин (НФ-АГД), 3-амино-5-морфолинметил-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ). Была проведена валидация методики и исследовано наличие данной группы противомикробных препаратов в мясном сырье, полученном от производителей и хозяйств Кемеровской области. Из общего количества представленных образцов остатки метаболитов нитрофуранов обнаружены в 18,6% пробах, что свидетельствует о несоответствии данного вида сырья действующему законодательству.

Ключевые слова: метаболиты нитрофуранов, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, мясное сырье, антибиотики, безопасность, хромато-масс-спектрометр, линейность, точность методики, хроматограмма.

USING THE HPLC-MS/MS METHOD TO DETERMINE THE RESIDUAL AMOUNT OF NITROFURAN METABOLITES IN MEAT PRODUCTS

©2020

Chaplygina Olga Sergeevna, postgraduate student

Podlegaeva Tatiana Victorovna, candidate of technical sciences, associate professor

of the department of technology and organization of public catering

Ostroumov Lev Aleksandrovich, doctor of technical sciences, professor,

chief scientific officer of the research Institute of biotechnology

Golubtsova Yulia Vladimirovna, doctor of technical sciences, professor of the department of technology and organization of public catering, head of department of technology and organization of public catering

Kemerovo State University

(Kemerovo, 650000, Russian Federation, Krasnaya st., 6,

e-mails: chaplygina_95@mail.ru, tpodlegaeva@yandex.ru, ula.gol@mail.ru: ula.gol@mail.ru)

Abstract. Food products of animal origin are now often a danger to the life and health of the population due to the content of various food and drug additives used both at the stage of animal rearing, and at the stage of production and storage of products. One of these elements in meat products may be antibiotics of various classes used in animal husbandry and veterinary medicine as growth promoters or for the prevention and treatment of a number of diseases. An important task of production is to prevent this type of product from being used as an independent product or as a raw material. To solve such problems, we need accurate and effective methods for determining antibiotics in food products. The paper considers the possibility of applying the method of high-performance liquid chromatography with a mass spectrometric detector to the analysis of meat raw materials for the residual amount of nitrofurans metabolites-3-amino-2-oxazolidinone (NF-aos), 1-amino-hydantoin (NF-AGD), 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (NF-AMAZ). The method was validated and the presence of this group of antimicrobials in raw meat obtained from producers and farms in the Kemerovo region was investigated. Out of the total number of samples presented, residues of nitrofurans metabolites were found in 18.6% of the samples, which indicates that this type of raw material does not comply with current legislation.

Keywords: nitrofurans metabolites, high-performance liquid chromatography, validation, meat raw materials, antibiotics, safety, chromatography-mass spectrometer, linearity, accuracy of the technique, chromatogram.

Введение. Пищевые продукты животного происхождения в настоящее время нередко представляют собой опасность для жизни и здоровья населения в силу содержания различных пищевых и лекарственных добавок, используемых как на этапе выращивания животного, так и на этапе производства и хранения продукции. Одним из таких элементов в мясной продукции могут являться антибиотики различных классов, используемые в животноводстве и ветеринарии в качестве стимуляторов роста или для профилактики и лечения ряда заболеваний.

Нитрофураны – группа противомикробных препаратов, которые характеризуются довольно широким спектром действия и являются в настоящее время одним из самых распространенных групп противомикробных препаратов. Несмотря на установленное законом запрещение во многих странах Европейского союза использования нитрофуранов, они продолжают оставаться доступными для использования в ветеринарии как в самих странах ЕС, так и во многих развивающихся странах по причине их эффективности и доступности. Решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 содержание антибиотиков группы нитрофураны и их метаболиты не допускаются в переработанной продукции животного происхождения, в том числе и сырье.

Нитрофураны обладают быстрым метаболизмом. Поэтому определить начальные соединения в продукции практически невозможно. После введения препарата через определенное время нитрофурановые метаболиты создают прочные связи с белками, в результате чего могут сохраняться в организме животного длительное время. Данные соединения накапливаются в мышечной ткани животных, а также выделяются с молоком здоровых и больных маститом коров. Процесс выведения препаратов происходит в разные сроки, в среднем он занимает 24 - 36 ч. Если производители не выдерживают положенный срок, остаточные количества метаболитов антибиотика обнаруживаются в мясе или молоке, и соответственно, через данные продукты попадут в организм человека [1,2]. Последствия их присутствия очевидны: они могут нарушать водно-солевой баланс, инактивируют ферменты, влияют на работу сердечно-сосудистой системы, снижают уровень белка в плазме крови и вызывают анемию и др.

Ученые всего мира обеспокоены проблемой безопасности пищевой продукции и используют различные методы и их модификацию для выявления противомикробных препаратов. В настоящее время подходы к обнаружению антибиотиков в пищевых продуктах строятся на инструментальных методах и методах биологических [3-7]. Инструментальные методы широко используются в методиках определения остатков противомикробных препаратов в пищевых продуктах во многих странах мира. Среди такой группы методов большую популярность, связанную с высокой точностью, эффективностью имеют методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и

комбинацию хроматографии с масс-спектрометрией.

Важной задачей стоит не допускать такого рода продукцию для употребления, как в виде самостоятельного продукта, так и в качестве сырья. Для решения подобных задач необходимы точные и эффективные способы определения антибиотиков в пищевых продуктах, адаптированные к практическим условиям.

Целью работы является установление пригодности и валидация методики высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором для определения метаболитов нитрофуранов в мясной продукции.

Методы, материалы и результаты исследований. Для исследования использовали методику определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором по ГОСТ 32014-2012. Пробоподготовку проводили по ГОСТ 32014-2012.

Эксперимент проводили на приборе Хромато-масс-спектрометр *LCMS-8040 Shimadzu Corporation*. Подготовка хромато-масс-спектрометра к работе и создание метода «*NITROFURANS.clm*» осуществлялась и в соответствии с техническим руководством по эксплуатации прибора с использованием ПО *LadSolutions LCMS Release5.86. SP1*.

Градуировочные кривые строили в форме зависимости отношения массовой концентрации каждого нитрофенильного метаболита нитрофурана к массовой концентрации соответствующего дейтерированного нитрофенильного метаболита нитрофурана (внутреннего стандарта) от отношения площади хроматографического пика каждого нитрофенильного метаболита нитрофурана к площади пика дейтерированного нитрофенильного метаболита нитрофурана (внутреннего стандарта) для более интенсивного фрагментного иона.

В качестве «чистых проб» были использованы пробы различных матриц (4187м мясо говядины; 5162м мясо свинины; 4348м мясо птицы), предварительно исследованных на отсутствие метаболитов нитрофуранов методом иммуноферментного анализа. Валидацию методики проводили на одном виде мясного сырья – мышечной ткани крупного рогатого скота.

Постановку методики выполняли в следующих условиях: температура окружающей среды – 20-250С; атмосферное давление – 84 - 100 кПа; относительная влажность воздуха - 60 - 80%; напряжение в электросети - (220 ± 20) В; частота тока в электросети -49-51 Гц.

На втором этапе исследований нами был проведен анализ 43 проб мясной продукции, полученных от предприятий и хозяйств Кемеровской области на содержание остаточного количества метаболитов нитрофуранов: 3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ), 1-амино-гидантоин (НФ-АГД), 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ), (2-нитрофенил)

метилен-семикарбазид (НФ-СЕМ). Из них 12 проб мышечной ткани крупного рогатого скота, 18 проб мышечной ткани свиней, 13 проб – мышечной ткани птицы. Исследования проводили в период с февраля по июнь 2020 г.

Изложение основного материала исследования. Валидация методики проводилась по следующим параметрам: правильность (истинность/восстановление), повторяемость, воспроизводимость, линейность. При указанных выше условиях было определено время выхода каждого из метаболитов нитрофуранов, мин:

НФ-АОЗ/ НФ- d4-АОЗ (внутренний стандарт) – 3,544/3,505;

НФ-АМОЗ/ НФ- d5-АМОЗ (внутренний стандарт) – 2,294/2,244;

НФ-АГД/ НФ-(C13)3-АГД (внутренний стандарт) – 3,402/3,433;

НФ-СЕМ/ НФ-1,2- N15,C13-СЕМ (внутренний стандарт) – 3,495/ 3,545.

Время выхода исследуемых метаболитов практически соответствует времени выхода по внутреннему стандарту, различаясь лишь в сотых долях.

Правильность метода оценивали с помощью сертифицированного эталонного материала (*CRM*) путем количественного измерения метаболитов. Для определения истинности исследовали 6 повторов *CRM* в соответствии с инструкциями по тестированию, применяемыми для данного метода. Обобщенная хроматограмма метаболитов нитрофуранов при концентрации $C=5$, мк/кг представлена на рисунке 1.

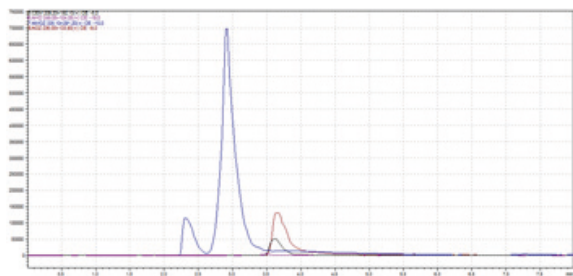


Рисунок 1 – Хроматограмма стандартных образцов метаболитов нитрофуранов

Обобщенные средние данные по оценке правильности (истинности/воспроизводимости) метода представлены в таблице 1.

Критерием приемлемости являлся среднее значение восстановления, скорректированное на 100%. Его средняя величина должна находиться в пределах допустимых значений. По результатам исследований показано, что по всем концентрациям среднее значение восстановления находится в пределах допустимых значений, что говорит о правильности и точности выбранного метода.

Повторяемость данной методики определяли в 6 повторах путем исследования мышечной ткани говядины, обогащенной аналитом на трех различных уровнях концентрациях: в 1, 1,5 и 2 раза больше минимального рабочего предела или в 0,5, 1 и 1,5 раз

больше разрешенного предела. Критерием оценки повторяемости служит коэффициент вариации. По результатам исследований определено, что коэффициент вариации воспроизводимости для растворов с концентрацией метаболита 5,10,20 мкг/кг составил 19,3, 21,4, 23,8 %. По данным 2002/657/ЕС решения комиссии Таможенного Союза для подтверждения точности методики коэффициент вариации воспроизводимости не должен превышать межлабораторный коэффициент вариации. В нашем эксперименте межлабораторный коэффициент составил 28,8, 32,0, 35,5%, соответственно. Результаты показывают соответствие требованиям документа, что говорит о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 1 – Оценка правильности метода

Уровень концентрации, мкг/кг	Среднее значение восстановления, %	Допустимое значение	Метаболит
C1 = 5	96	От 70% до 110%	АОЗ
	94		АМОЗ
	83		АГД
	86		СЕМ
C2 = 10	98	От 80% до 110%	АОЗ
	101		АМОЗ
	91		АГД
	89		СЕМ
C3 = 20	95	От 80% до 110%	АОЗ
	101		АМОЗ
	100		АГД
	101		СЕМ

Для определения диапазона применения методики была определена линейность с использованием растворов рабочих стандартных образцов изучаемых метаболитов. Оценку линейности также проводили в трех концентрациях рабочих стандартных образцов изучаемых метаболитов. Коэффициент корреляции является оценкой линейности методики.

Результаты исследований показали:

- для метаболита 3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ) уравнение линейности ($0,745452 \cdot X$), коэффициент корреляции составил 0,9999876;

- для метаболита 3-амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ) – уравнение линейности описано, как ($0,538290 \cdot X$), коэффициент корреляции при этом составил 0,9998994;

- для метаболита 1-амино-гидантоин (АГД) – уравнение линейности ($0,322419 \cdot X$), коэффициент корреляции - 0,9998826.

- уравнение линейности для (2-нитрофенил)метилен-семикарбазид (НФ-СЕМ) представлено в виде ($0,461188 \cdot X$), коэффициент корреляции - 0,9992603.

Наблюдаемый диапазон линейности составил (1-1000) нг/см³.

Совокупность данных можно описать прямой линией, если данный коэффициент имеет значения, близкие к 1,0. В данном случае можно говорить о подтверждении линейности (рис.2).

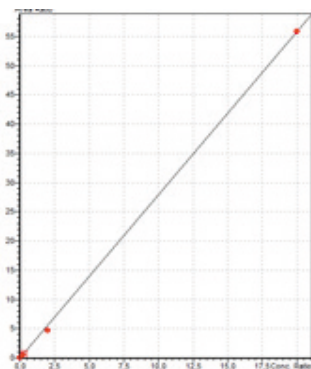


Рисунок 2 – График линейности методики

Таким образом, данная методика отличается точностью, правильностью, линейностью. На следующем этапе определяли остаточное количество метаболитов нитрофуранов в мясной продукции, используя вышеописанную методику. Данные исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Обнаружение остаточного количества метаболитов нитрофуранов в мясной продукции (февраль-июнь 2020 г.)

Объект исследования	Метаболит нитрофурана	Количество проб для исследования	Положительных проб	
			количество	%
Мышечная ткань крупного рогатого скота	3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ)	12	0	0
	3-амино-5-морфолин-метил-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ)		0	0
	1-амино-гидантоин (АГД)		0	0
	(2-нитрофенил) метил-семикарбазид (НФ-СЕМ)		0	0
Мышечная ткань свиней	3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ)	18	2	11,1
	3-амино-5-морфолин-метил-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ)		0	0
	1-амино-гидантоин (АГД)		0	0
	(2-нитрофенил) метил-семикарбазид (НФ-СЕМ)		0	0
Мышечная ткань птицы	3-амино-2-оксазолидинон (НФ-АОЗ)	13	2	15,4
	3-амино-5-морфолин-метил-2-оксазолидинон (НФ-АМОЗ)		0	0
	1-амино-гидантоин (АГД)		4	30,8
	(2-нитрофенил) метил-семикарбазид (НФ-СЕМ)		0	0
Всего:		43	8	18,6

Данные показали, что из общего количества представленных образцов (43) в 8 обнаружены остатки метаболитов нитрофуранов, что в среднем составило 18,6%. Из них доля 3-амино-2-оксазолидинона (АОЗ) составила 9,3% от общего количества проб, причем в двух случаях метаболиты были обнаружены в мышечной ткани свиней и в тех же количествах в мясе птицы. Аналогичное значение (4 пробы) составило

при обнаружении 1-амино-гидантоина (АГД), однако, в данном случае все образцы принадлежали мышечной ткани птицы.

Заключение. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором соответствует требованиям 2002/657/EC, данная методика воспроизводима, отличается достоверностью и точностью и позволяет объективно оценить количественное содержание нитрофуранов в мясном сырье, что играет важную роль в обеспечении качества продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Havelaar, A.H. A summary index for antimicrobial resistance in food animals in the Netherlands/ Havelaar, A.H., Graveland, H., van de Kasstele, J. et al. //BMC Vet Res. - 2017. - №13(305). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1216-z>
2. Ekakoro, J.E. Drivers, alternatives, knowledge, and perceptions towards antimicrobial use among Tennessee beef cattle producers: a qualitative study/ Ekakoro, J.E., Caldwell, M., Strand, E.B. et al.//BMC Vet Res. – 2019. –Vol. 15, 16. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1731-6>
3. Hendrickson O.D. Development of a double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs /Hendrickson OD, Zvereva EA, Zherdev AV, Godjevargova T, Xu C, Dzantiev BB.// Food Chem. – 2020. – Vol.318:126510. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126510
4. Jalili .Detection of penicillin G residues in milk based on dual-emission carbon dots and molecularly imprinted polymers / Jalili, Roghayeh; Khataee, Alireza; Rashidi, Mohammad-Reza// Food Chemistry, 2020. – 314: 126172
5. Li, Zhao Bin. Production of generic monoclonal antibody and development of chemiluminescence immunoassay for determination of 32 sulfonamides in chicken muscle. /Li, Zhao Bin; Cui, Peng Lei; Liu, Jing; с соавторами// Food Chemistry. - 2020. –Vol. 311: 125966
6. Chen, Xiang-Xiu. A dichromatic label-free aptasensor for sulfadimethoxine detection in fish and water based on AuNPs color and fluorescent dyeing of double-stranded DNA with SYBR Green I/ Chen, Xiang-Xiu; Lin, Zheng-Zhong; Hong, Cheng-Yi// Food Chemistry. – Vol. 309: 125712
7. Закревский В.В. Мониторинг мясного сырья из разных стран на содержание метаболитов нитрофуранов/ В. В. Закревский, С. Н. Лелеко// Вестник СПбГУ. - 2014. - № 2. – С.66-74
8. Li, Z. Production of generic monoclonal antibody and development of chemiluminescence immunoassay for determination of 32 sulfonamides in chicken muscle/ Li, Z., Cui, P., Liu, J., & Wang // J.Food chemistry. – 2019. – Vol. 311: 125966 .
9. Zhou, Q. A novel hapten and monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for sulfonamides in edible animal tissues/ Zhou, Q. , Peng, D., Wang, Y., Pan, Y., Wan, D., Zhang, X., & Yuan, Z. // Food chemistry, 2014. - Vol .154. С. 52-62 .
10. Xu, S.A heterometallic sodium(i)-europium(iii)-organic layer exhibiting dual-responsive luminescent sensing for nitrofurans antibiotics, Cr2O72- and MnO4- anions / Xu, S., Shi, J., Ding, B., Liu, Z., Wang, X., Zhao, X., & Yang, //E.Dalton transactions, 2019. - Vol. 48 5. С. 1823-1834 .
11. Vass, M. Nitrofurans antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis/ Vass, M., Hruska, K., & Fránek, M. //Veterinarni Medicina, 2018. - Vol .53. С. 469-500.
12. Fernando, R. Determination of nitrofurans metabolites in shrimp muscle by liquid chromatography-photo diode array detection/ Fernando, R., Munasinghe, D., Gunasena, A., & Abey-

nayake, P. //Food Control, 2018. - Vol .72. - C. 300-305.

13. Śniegocki, T. New Method of Analysis of Nitrofurans and Nitrofurantoin Metabolites in Different Biological Matrices Using UHPLC-MS/MS/ Śniegocki, T., Giergiel, M., Sell, B., & Posyniak, A.// Journal of Veterinary Research,2018. - Vol. 62. C. 161 - 166.

14. Zhang, Y. Two cadmium(II) coordination polymers as luminescent sensors for the detection of nitrofurantoin/nitroimidazole antibiotics/ Zhang, Y., Yang, J., Zhao, D., Liu, Z., Li, D., Fan, L., & Hu, T.// CrystEngComm, 2019. - Vol .21. C. 6130-6135.

15. Kulikovskii, A. V. Determination of Nitrofurantoin Metabolites in Muscular Tissue by High-Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection /Kulikovskii, A. V., Gorlov, I. F., Slozhenkina, M., Vostrikova, N., Ivankin, A. N., & Kuznetsova, O. //Journal of Analytical Chemistry, 2019. – Vol. 74. C. 906 - 912.

16. Wang, K. Determination of Nitrofurantoin Metabolites in Fish by Ultraperformance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection with Thermostatic Ultrasound-Assisted Derivatization/ Wang, K., Kou, Y., Wang, M., Ma, X., & Wang, J. //ACS Omega, 2020. - Vol. 5. - C. 18887 - 18893.

17. Yu, Y. Novel fluorescence labeling reagent 4-(carbazole-9-yl)-benzyl chloroformate and its application in the determination of nitrofurantoin metabolites compounds in foodstuffs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection / Yu, Y., Li, N., Jin, Q., Ji, Z., Sun, Z., Li, G., Zhang, S., & You, J. // Microchemical Journal, 2019. - Vol. 145. - C. 9-17.

18. He, B. Electrochemical determination of nitrofurantoin residues at gold nanoparticles/graphene modified thin film gold electrode/ He, B., & Liu, H. // Microchemical Journal, 2019. – Vol. 150. C. 104108.

19. Aldeek, F. Accurate Quantitation and Analysis of Nitrofurantoin Metabolites, Chloramphenicol, and Florfenicol in Seafood by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Method Validation and Regulatory Samples / Aldeek, F., Hsieh, K., Ugochukwu, O. N., Gerard, G., & Hammack, W. //Journal of agricultural and food chemistry, 2018. – Vol. 66 20. C. 5018-5030 .

20. Zhang, F. A Lanthanide MOF Thin-Film Fixed with Co₃O₄ Nano-Anchors as a Highly Efficient Luminescent Sensor for Nitrofurantoin Antibiotics /Zhang, F., Yao, H., Chu, T., Zhang, G., Wang, Y., & Yang, Y.// Chemistry, 2017. - Vol .23 43. C.10293-10300 .

21. Cooper, K. M. Development of Antibodies and Immunoassays for Monitoring of Nitrofurantoin Antibiotics in the Food Chain / Cooper, K. M., Fodey, T., Campbell, K. L., & Elliott, C. T.// Current Organic Chemistry, 2018. - Vol. 21. - C. 2675-2689.

22. Wang, Q. A multiplex immunochromatographic test using gold nanoparticles for the rapid and simultaneous detection of four nitrofurantoin metabolites in fish samples/ Wang, Q., Liu, Y., Wang, M., Chen, Y., & Jiang, W. //Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. – Vol. 410. C. 223-233.

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ при государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2694.2020.4)

Статья поступила в редакцию 20.08.2020

Статья принята к публикации 14.09.2020