

# Определение остаточного количества антибиотиков в мясе с помощью приборов *Shimadzu*

## Ключевые слова:

анализ, определение антибиотиков, *Shimadzu*, контроль, ветеринарные препараты

В рамках реализации Плана государственного мониторинга качества и безопасности пищевых продуктов Россельхознадзор, Роспотребнадзор и Роскачество регулярно проводят масштабные проверки на наличие запрещенных веществ и превышение максимально допустимых уровней остатков ветеринарных препаратов, стимуляторов роста животных, лекарственных средств (в том числе антибиотиков) в продуктах животного происхождения и сырье. В данной статье описаны примеры применения оборудования компании *Shimadzu* для обнаружения остаточного количества антибиотиков в мясе

**Татьяна Борисова**

консультант по аналитическому оборудованию,  
[smo\\_tb@shimadzu.ru](mailto:smo_tb@shimadzu.ru)

Проблема загрязнения животноводческой продукции антибиотиками на сегодняшний день является предметом международного обсуждения. По данным Роспотребнадзора, в ряде стран Европейского союза (в Швеции, Дании) применение антибиотиков практически исключено в птицеводстве. В США, где распространена концепция обязательного в современных условиях использования антибиотиков в животноводстве для снижения уровня инфицирования животных и риска передачи заболеваний человеку, критикуется позиция ЕС, запретившего кормовые антибиотики. Китай заявляет, что до тех пор, пока население страны не будет обеспечено достаточным количеством мяса, в стране будут применять антибиотики при его производстве<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Всемирный день прав потребителей проходит 15.03.2016 г. под девизом «Исключить антибиотики из меню» / Официальный сайт Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Красноярской области URL: <http://04.rospotrebnadzor.ru/index.php/otdel-zpp/org/5770-15032016.pdf> (Дата обращения: 05.09.2018 г.).

В Российской Федерации в животноводстве и ветеринарии наиболее часто используются кормовые и лечебные антибиотики, такие как гризин, бацитрацин, группы тетрациклинов, пенициллинов, стрептомицина и левомицетина (хлорамфеникола). Содержание других антибиотиков контролируется только в том случае, если есть информация об их использовании. Согласно положениям технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011<sup>2</sup> переработанное продовольственное (пищевое) сырье животного происхождения должно быть получено от здоровых продуктивных животных только по истечении сроков выведения из организма лекарственных средств для ветеринарного применения, в том числе антибиотиков. При этом переработчик, получив информацию от поставщика об их применении, может проверить поступающее сырье на наличие остатков этих антибиотиков.

В ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013<sup>3</sup>, а также в СанПиН 2.3.2.2871–11<sup>4</sup> установлены максимально допустимые уровни для 56 антибиотиков, значения которых согласуются с требованиями регламентов ЕС. При этом в России нормативы содержания тетрациклинов в пищевых продуктах сохранены на более жестком уровне ( $\leq 0,01$  мг/кг во всех нормируемых продуктах), чем нормативы в стандартах Комиссии Кодекс Алиментариус (от  $\leq 0,1$  до  $\leq 1,2$  мг/кг в зависимости от продукта) и ЕС (от  $\leq 0,1$  до  $\leq 0,6$  мг/кг).

В обеспечении качества и безопасности пищевой продукции в мировом масштабе важную роль играют разработка международных стандартов и совершенствование системы контроля содержания антибиотиков в пищевых продуктах. В феврале 2018 г. ЕЭК подписала так называемое решение о контроле антибиотиков в сырье<sup>5</sup>. В этом документе перечислены максимально допустимые уровни содержания остатков ветпрепаратов (в том числе ан-

<sup>2</sup> ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» принят Решением Совета ЕЭК № 880 от 09.12.2011 г. (ред. от 10.06.2014 г.).

<sup>3</sup> ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции» принят Решением Совета ЕЭК № 68 от 09.10.2013 г.

<sup>4</sup> СанПиН 2.3.2.2871–11 «Изменения № 24 к СанПиН 2.3.2.1078–01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов»» утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 79 от 01.06.2011 г.

<sup>5</sup> Решение Коллегии ЕЭК № 28 «О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методах их определения» от 13.02.2018 г.

# Испытания, измерения, анализ

## Библиотека спектров анализируемых антибиотиков

[табл. 1]

Хинолоновые препараты	Сульфаниламидные препараты
Марбофлоксацин	Сульфадиазин
Офлоксацин	Сульфамеразин
Ципрофлоксацин	Сульфадимидин
Данофлоксацин	Сульфамонометоксин
Энрофлоксацин	Триметоприм
Орбифлоксацин	Сульфаметоксазол
Сарафлоксацин	Орметоприм
Дифлоксацин	Сульфадиметоксин
Оксилиновая кислота	Сульфавинокалин
Налидиксовая кислота	Пириметамин
Флумекин	Дифуразон
Пиромидиновая кислота	Никарбазин

тибиотиков), которые могут содержаться в сырье и в переработанной пищевой продукции животного происхождения. В перечне приведены 72 соединения и возможные методики их определения, однако это не окончательный перечень контролируемых ветеринарных препаратов — сейчас рассматривается возможность его расширения. В качестве экспресс-метода предлагается использовать иммуноферментный анализ как наиболее простой, относительно дешевый и быстрый. Однако он недостаточно точен и надежен. Для количественного определения остаточных количеств антибиотиков рекомендуются высокочувствительные хромато-масс-спектрометрические методы анализа.

### Универсальный анализатор для обнаружения в мясных продуктах синтетических антибиотиков

Компания Shimadzu предлагает универсальный анализатор для скрининга 24 синтетических антибиотиков в мясе (см. табл. 1), большинство из которых приведены в перечне Решения № 28, и ВЭЖХ-МС/МС систему — для количественного определения 89 ветеринарных лекарственных препаратов.

Рис. 1  
Анализатор антибиотиков



Хроматографическая система LC2040C 3D, RF 20Axs (далее — анализатор антибиотиков) — это универсальное решение для качественного определения синтетических антибиотиков в мясных продуктах на основе жидкостного хроматографа *i*-серии. Благодаря комплексному решению (в комплект входят: колонка, миксер и CD диск с оптимизированными методиками анализа и библиотекой спектров антибиотиков, см. рис. 1), пользователю не нужно подбирать условия хроматографического анализа. Это увеличивает

эффективность работы оператора и производительность лаборатории в целом. Система настолько проста в эксплуатации, что может управляться оператором с базовыми навыками работы на жидкостном хроматографе.

### Пример использования анализатора для определения антибиотиков в мясе птицы, в говядине и свинине

Ввиду различных физических свойств сульфаниламидов и хинолонов используются разные методы предварительной обработки пробы и условия анализа [1, 2]. Так, для определения сульфаниламидных препаратов использовали пробоподготовку по методу *QuEChERS*<sup>6</sup>, в процессе которой из навески образца массой 10 г удаляли жир, проводили упаривание, повторное растворение. Время анализа для определения 12 антибиотиков сульфаниламидного ряда в образцах мяса курицы и говядины составило всего 25 минут.

Пробоподготовка образцов мяса птицы и свинины для определения хинолоновых препаратов заключалась в экстракции навески массой 1 г ацетонитрилом, удалении жирового слоя и последующем упаривании и растворении. Время анализа 12 соединений хинолонового ряда составило 22 минуты. Условия анализа для определения антибиотиков разных классов приведены в табл. 2. При этом максимально допустимые уровни содержания всех антибиотиков составили 0,01 мг/кг, концентрация раствора образцов после пробоподготовки — 0,025 мг/л. Результаты анализа приведены на рис. 2 и 3.

В исследуемых образцах были обнаружены антибиотики в небольших концентрациях. Дополнительно при обработке полученных данных провели сравнение каждого пика стандартной смеси антибиотиков, регламентированных стандартами ЕС, с пиками, полученными при анализе образцов мяса, чтобы определить, присутствуют ли в анализируемых пробах антибиотики с концентрацией выше заявленных стандартами ЕС. Операция, проведенная с помощью анализатора антибиотиков Shimadzu, позволяет проводить быстрый скрининг-анализ целевых компонентов, не требуя выполнения пользователем дополнительного комплексного анализа.

### ВЭЖХ-МС/МС метод анализа

Если в процессе скринингового исследования продуктов животного происхождения выявляют превышение максимально допустимых уровней антибиотиков, необходимо провести их количественное определение. Для этого используют ВЭЖХ-МС/МС метод анализа как наиболее точный, высокочувствительный, селективный и достоверный. Ниже приведена методика количественного определения 89 ветпрепаратов в свинине с помощью хромато-масс-спектрометра LCMS 8050 Shimadzu [3].

<sup>6</sup> *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) — быстрый метод, позволяющий извлекать из проб остаточные количества целевых соединений, удаляя нежелательные помехи (органические кислоты, липиды, пигменты, сахара и др.).

# Определение остаточного количества антибиотиков в мясе с помощью приборов Shimadzu

При пробоподготовке использовали метод *QuEChERS*. Обычно он состоит из двух этапов: экстракции 1 %-ым раствором уксусной кислоты в ацетонитриле и твердофазной экстракции. В данном примере применяли только первый этап: навеску образца массой 10 г поместили в 50 мл пробирку, добавили 5 мл воды и энергично встряхивали в течение нескольких минут. Далее в пробирку добавили 10 мл 1 %-го раствора уксусной кислоты в ацетонитриле, экстракционные соли *QuEChERS* и снова встряхивали в течение 1 минуты. После центрифугиро-

вания (3 мин) отобрали аликвоту верхнего слоя ацетонитрила и провели ВЭЖХ-МС/МС анализ.

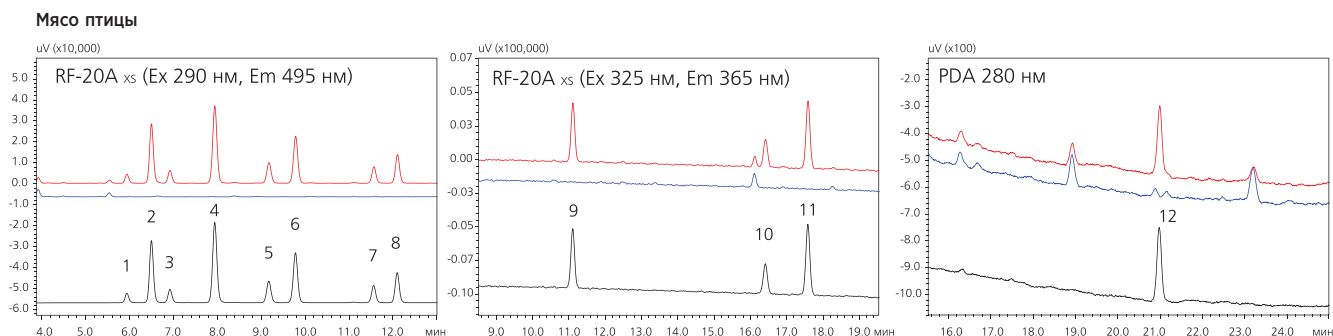
На *рис. 4* показана хроматограмма раствора образца свинины с добавлением стандартной смеси в режиме измерения *MRM*<sup>7</sup>.

В *табл. 3* приведены пределы количественного определения ветеринарных лекарственных средств в стандартном растворе минимальной концентрации и матри-

<sup>7</sup> Мониторинг множественных реакций.

**Рис. 2**

Хроматограммы образцов мяса птицы: образец с добавлением стандартной смеси антибиотиков (красная линия), образец (синяя линия), стандартная смесь (черная линия)

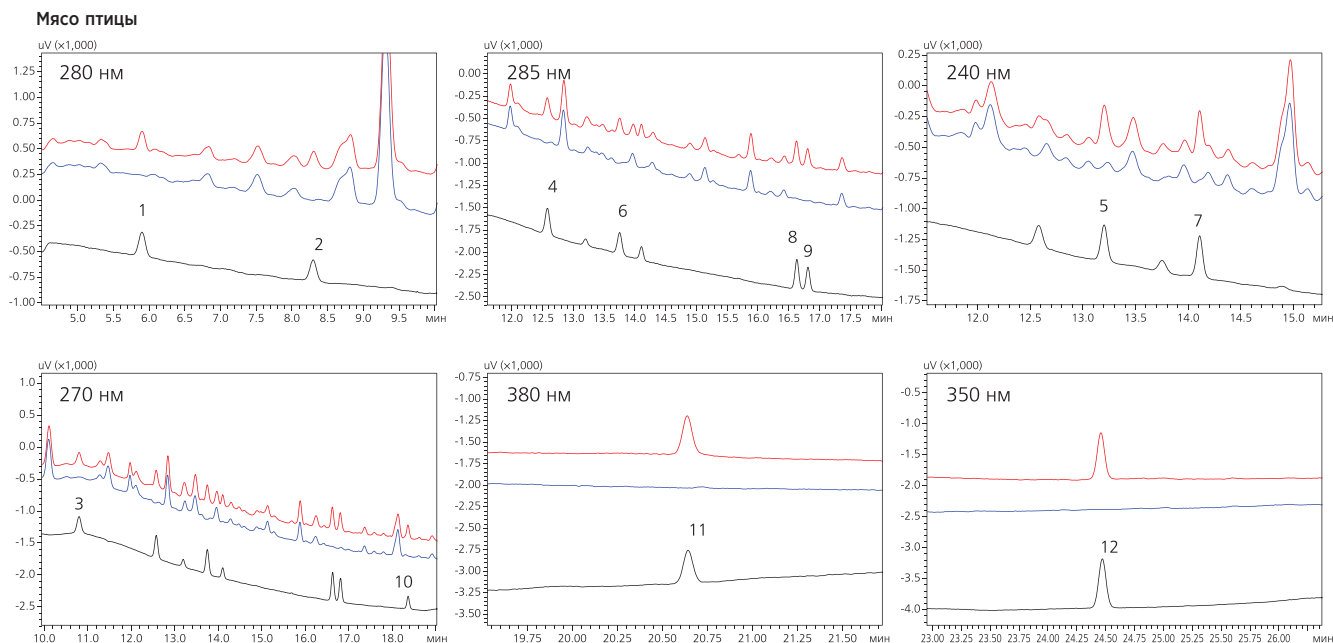


■ Пики соединений концентрацией 0,025 мг/л каждый

1. Марбофлоксацин. 2. Офлоксацин. 3. Ципрофлоксацин. 4. Данофлоксацин. 5. Энрофлоксацин. 6. Орбифлоксацин.
7. Сарафлоксацин. 8. Дифлоксацин. 9. Оксолиновая кислота. 10. Налидиксовая кислота. 11. Флумекин. 12. Пиримидиновая кислота

**Рис. 3**

Хроматограммы образцов мяса птицы: образец с добавлением стандартной смеси антибиотиков (красная линия), образец (синяя линия), стандартная смесь (черная линия)



■ Пики соединений концентрацией 0,025 мг/л каждый

1. Сульфадиазин. 2. Сульфамеразин. 3. Сульфадимидин. 4. Сульфамонетоксин. 5. Триметоприм. 6. Сульфаметоксазол. 7. Орметоприм.
8. Сульфадиметоксин. 9. Сульфаквиноксалин. 10. Пириметамин. 11. Дифуразон. 12. Никарбазин

# Испытания, измерения, анализ

## Условия анализа для определения сульфаниламидов и хинолонов

[табл. 2]

	Сульфаниламиды	Хинолоны
Система	LC-2040 C 3D	LC-2040 C 3D, RF-20AXS
Колонка	Shim-pack FC-ODS (150 мм × 4.6 мм, 3 мкм)	
Подвижная фаза (градиентное элюирование)	A) 20 ммоль/л натрий-фосфатный буфер, содержащий 0,1М перхлорат натрия B) Ацетонитрил/метанол в пропорции: 80/20	
Скорость потока	1,0 мл/мин	
Температура колонки	50 °С	
Объем вводимой пробы	20 мкл	5 мкл
Детектирование	240 нм, 270 нм, 280 нм, 285 нм, 350 нм, 380 нм	PDA: 280 нм RF: Ex. 290 нм, Em. 495 нм; Ex. 325нм, Em. 365 нм
Температура ячейки	40 °С	40 °С (PDA), 30 °С (RF)

це стандартного раствора *min* и *max* концентраций, в табл. 4 — условия анализа.

Основная цель эксперимента: определить влияние матрицы на пределы количественного определения антибиотиков в исследуемых образцах методом ВЭЖХ-МС/МС. Для исследования были взяты чистый стандарт ветеринарного лекарственного препарата с минимальной концентрацией и образцы мяса с добавлением этих же стандартных растворов минимальной и максимальной концентраций. В ходе анализа было выявлено, что матрица оказывает влияние на пределы количественного определения ряда ветеринарных препаратов. При этом 71 соединение имело хорошую степень извлечения (80 %), 17 соединений — плохую (19 %). Большинство этих соединений представляли собой хинолоны.

Более подробное описание анализа с приведением сравнения сходимости полученных данных в разных ма-

## Пределы количественного обнаружения ветеринарных лекарственных средств

[табл. 3]

Ветеринарное лекарственное средство	Стандартный р-р Min конц.	Образец с добавлением станд. р-ра		Ветеринарное лекарственное средство	Стандартный р-р Min конц.	Образец с добавлением станд. р-ра	
		Min конц.	Max конц.			Min конц.	Max конц.
Гентамицин	0.5	1	50	Сульфалоропиридазин	0.02	0.02	20
Сульфаниламид	1	1	50	Сульфадиметоксин	0.02	0.02	10
Левамизол	0.05	0.05	50	Тилозин	0.05	0.05	50
Линкомицин	0.01	0.01	10	Сульфаметоксазол	0.02	0.1	10
5-Пропилсульфонил-1-бензимидазол-2-амин	0.05	0.05	10	Сульфазетоксипиридазин	0.02	0.02	10
Диаверидин	0.01	0.01	10	Тиамулин	0.01	0.01	50
Триметоприм	0.02	0.02	20	Флорфеникол	0.5	10	50
Марбофлоксацин	0.01	0.01	50	2-ацетиламино-5-нитротиазол	0.05	0.05	50
Сульфисомидин	0.02	0.02	20	Сульфатроксазол	0.01	0.01	5
Норфлоксацин	0.5	0.5	50	Лейкомицин	0.01	0.01	50
Орметоприм	0.02	0.02	10	Сульфизоксазол	0.01	0.05	50
Тиабендазол	0.01	0.01	10	Оксилиновая кислота	0.01	0.1	50
Ципрофлоксацин	0.05	0.5	10	Хлорамфеникол	0.5	1	50
Нео спирамицин I	0.01	0.05	10	Хлорсульфон	0.5	1	50
Данофлоксацин	0.1	0.1	10	Сульфабензамид	0.01	0.01	10
Энрофлоксацин	0.05	0.1	50	Этопабат	0.01	0.01	10
Окситетрациклин	0.01	0.1	50	Сульфадоксин	0.02	0.02	20
Ксилазин	0.01	0.01	10	Сульфаквиноксалин	0.02	0.02	10
Орбифлоксацин	0.05	0.05	50	Преднизалон	0.1	0.05	20
Сульфациетамид	1	1	50	Офлоксацин	0.5	0.5	50
Кленбутерол	0.01	0.01	10	Флубендазол	0.01	0.01	50
Тетрациклин	0.05	0.01	50	Метилпреднизалон	0.5	0.5	50
Спирамицин I	0.01	0.01	50	Налидиксовая кислота	0.01	0.01	50
Сарафлоксацин	0.5	0.5	50	Дексаметазон	0.5	0.5	50
Дифлоксацин	0.05	0.1	50	Флумеквин	0.01	0.01	50
Сульфадиазин	0.02	0.1	20	Бензилпенициллин	0.5	0.5	50
Сульфатиазол	0.02	0.1	20	Сульфанитран	0.2	0.2	50
Сульфапиридин	0.02	0.1	20	Сульфабромометазин	0.01	0.01	50
Карбадокс	0.05	0.05	10	бета-Тренболон	0.02	0.1	50
Пириметамин	0.02	0.02	20	Эмаектин V1a	0.01	0.01	50
Сульфамеразин	0.02	0.02	20	альфа-Тренболон	0.02	0.1	50
Хлортетрациклин	0.1	0.1	50	Пиромидиновая кислота	0.01	0.05	50
Тилмикозин	0.1	0.1	50	Зеранол	1	0.1	50
Тиамфеникол	1	1	50	Кетопрофен	0.01	0.05	50
Сульфадимидин	0.02	0.02	20	Тестостерон	0.01	0.05	10
Сульфаметоксидиазин	0.01	0.02	10	Фамфур	0.05	0.05	50
Сульфаметоксипиридазин	0.02	0.02	20	Фенобукарб (BPMC)	0.01	0.01	50
Сульфатиазол	0.01	0.01	50	Клостебол	0.05	0.05	50
Трихлорфон (DEP)	0.05	0.05	50	Диклофенак	0.01	0.01	50
Сульфамониметоксин	0.02	0.02	20	Меленгестрол ацетат	0.05	0.05	50
Фуразолидон	1	1	50	Темефос (абат)	0.01	0.5	50
Дифуразон	0.05	0.05	50	Аллетрин	0.1	1	50
Эритромицин А	0.01	0.01	50	Клозантел	0.01	0.01	10
Цефазолин	0.5	0.5	50	Монензин	0.01	0.01	10

# Определение остаточного количества антибиотиков в мясе с помощью приборов Shimadzu

Условия ВЭЖХ-МС/МС анализа

[табл. 4]

Колонка	Shim-pack ODS II (75 мм x 2,0 вн.д., 2,2 мкм)
Подвижная фаза А	0,1% Муравьиная кислота - вода
Подвижная фаза В	Ацетонитрил
Временная программа	1 %В (0 мин) → 15 %В (1 мин) → 40 %В (6 мин) → 100 %В (10-13 мин) → 1 %В (13,01-16 мин)
Скорость потока	0,2 мл/мин
Объем вводимой пробы	2 мкл
Температура термоста-та колонок	40 °С
Режим ионизации	Электроспрей (положительная и отрицательная ионизация)
Напряжение зонда	+2,0 кВ/-1,0кВ
Поток газа-распылителя	3 л/мин
Поток газа-осушителя	10 л/мин
Поток нагреваемого газа	10 л/мин
Температура линии де-сольватации	200 °С
Температура нагревательного блока	400 °С
Температура интер-фейса	400 °С

трицах (морепродукты и рыба, мясо птицы и свинина), а также примером получения стабильных данных при непрерывном анализе в течение трех дней приведено в приложении [3], которое можно найти в открытом доступе на сайте Shimadzu [4].

## Использованная литература:

1. Analysis of Residual Antimicrobials in Meat with Antimicrobial Screening System (Part 1) // Shimadzu. Application News № L509, Oct.2016
2. Analysis of Residual Antimicrobials in Meat with Antimicrobial Screening System (Part 2) // Shimadzu. Application News № L509, Oct.2016
3. Quantitative Analysis of Veterinary Drugs Using the Shimadzu LCMS-8050 Triple Quadrupole Mass Spectrometer // Shimadzu. Application News № C99, Jan.2015
4. Официальный сайт компании Shimadzu в России URL: <http://shimadzu.ru> / Сборник применений «Еда, напитки, сельскохозяйственная продукция», 2-е изд., С.109.



## Резюме

Shimadzu предлагает надежное и недорогое оборудование для оперативного скрининга антибиотиков и высокочувствительное масс-спектрометрическое оборудование для углубленного исследования продуктов животного происхождения и сырья. Использование на предприятиях высокотехнологичного, но простого в эксплуатации анализатора антибиотиков позволит производителю мясных изделий быстро отбраковывать недоброкачественное сырье при входном контроле.

Методика хромато-масс-спектрометрического анализа, реализованная на жидкостном тройном

квадрупольном масс-спектрометре LCMS 8050, позволяет менее чем за 15 минут определить 89 ветеринарных лекарственных препаратов, содержащихся в мясе. Использование хромато-масс-спектрометрии в сочетании с быстрой экстракцией методом QuEChERS — это получение достоверных результатов анализа за короткое время.

Метод хромато-масс-спектрометрии также подходит для определения остаточного количества антибиотиков в молоке и меде. Компания Shimadzu готова предложить решения под данные задачи.

## Читайте в ближайших номерах

Дрожжи — нежелательные «гости» пресервов

Проблема прослеживаемости в лабораторной практике

Интервью с директором по качеству

ЗАО «Московская пивоваренная компания»