РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ СУЛЬФАНІЛАМІДІВ ТА ТРИМЕТОПРИМУ У ЗРАЗКАХ МОЛОКА МЕТОДОМ УЕРХ-МС/МС ТА ЇЇ ВЕРИФІКАЦІЯ ШЛЯХОМ МІЖЛАБОРАТОРНИХ ВИПРОБУВАНЬ

М. В. Ридчук, канд. хім. наук,
С. І. Плотиця, науковий співробітник,
Д. В. Янович, д-р с.-г. наук,
З. С. Засадна, канд. біол. наук,
С. М. Кіслова, старший науковий співробітник,
Г. Л. Мисько, науковий співробітник

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

У статті представлено результати розробки та впровадження підтверджуючого УЕРХ-МС/МС методу для визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму у зразках цільного та сухого коров'ячого молока. Пробопідготовка зразків включає відновлення водою (у випадку сухого молока), відокремлення молочного жиру, шляхом центрифугування при 4 °С, осадження білків ацетонітрилом, з використанням ультразвукової інтенсифікації, екстракцію аналітів двокомпонентною сумішшю органічних розчинників із слабкого фосфатного буферного розчину, концентрування отриманих екстрактів, знежирення та відновлення мобільною фазою. Режим роботи тандем-мас-спектрометричного детектора, а саме – режим моніторингу множинних реакцій, забезпечив високу специфічність стосовно усіх десяти сульфаніламідів, молекули яких містять однакові структурні елементи, та триметоприму, оскільки для визначення кожного цільового аналіту використовували по три іонних переходи. Зразки для побудови калібрувальних графіків готували на матриці молока, що дозволило знехтувати врахуванням абсолютного витягу аналітів під час пробопідготовки, а також зменшити вплив матричних компонентів зразка на іонізацію аналітів. Основними перевагами розробленої методики є простота, експресність та економічна ефективність пробопідготовки, швидка процедура аналізу зразка (час хроматографічного розділення – 2,0 хв), висока селективність та чутливість – на рівні $\leq 0,5$ мкг/кг, яка значно перевершує вимоги до методів контролю залишків сульфаніламідів у молоці на рівні МДР (100 мкг/кг). Згідно з Рішенням Європейської Комісії 2002/657/ЕС, розраховано значення ССа та ССв сульфаніламідів та триметоприму в молоці. Придатність розробленої методики підтверджено на основі встановлених валідаційних параметрів за використання збагачених зразків молока та оцінки «введено – знайдено». Методику апробовано при аналізі навантажених зразків цільного та сухого коров'ячого молока (CV ~ 20 %). Розроблену методику верифіковано шляхом міжлабораторних порівняльних випробувань зразків сухого молока на вміст сульфаніламідів. Розроблений УЕРХ-МС/МС метод визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму у зразках цільного та сухого молока можна використовувати як для рутинного лабораторного аналізу молочних продуктів, так і для експертизи сумнівних чи підозрілих зразків.

Ключові слова: СУЛЬФАНІЛАМІДИ, ЗАЛИШКОВІ КІЛЬКОСТІ, МОЛОКО, УЕРХ-МС/МС, МІЖЛАБОРАТОРНІ ВИПРОБУВАННЯ.

THE DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR THE DETERMINATION OF SULFONAMIDES AND TRIMETOPRIM RESIDUAL QUANTITIES IN MILK SAMPLES BY UPLC-MS/MS METHOD AND ITS VERIFICATION THROUGH INTERLABORATORY TESTING

M. Rydchuk, S. Plotyca, D. Yanovych, Z. Zasadna, S. Kislova, H. Mysko

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

This manuscript presents the results of development and adoption of the confirmatory UPLC-MS/MS method for determination of sulfonamides and trimethoprim residues in whole and powdered cow's milk samples. Sample preparation includes a recovery with water (in the case of milk powder), separation of milk fat by centrifugation at 4 °C, proteins precipitation with acetonitrile using ultrasonic intensification, extraction of analytes with a two-component mixture of organic solvents from weak acidic phosphate buffer solution, concentration of obtained extracts, degreasing and reconstitution with the mobile phase. The use of tandem-mass spectrometric detector in multiple reaction monitoring mode provides high specificity for all ten sulfonamides, which molecules contain the same structural elements, and trimethoprim, as three ion transitions were used for each of the target analytes. The approach of matrix matched calibration on the milk matrix was applied, and it allowed us to disregard taking into consideration the absolute extraction of analytes during sample preparation, as well as the influence of sample matrix components on analytes ionization. The main advantages of the developed technique are simplicity, rapidity and cost effective sample preparation, fast procedure of sample analysis (the time of chromatographic separation is 2.0 min), high selectivity, and sensitivity at the level of $\leq 0.5 \mu\text{g/kg}$ (as compared with the maximum residues level of sulfonamides in dairy products, viz. $100 \mu\text{g/kg}$). According to the European Commission Decision 2002/657/EC, the values of CC α and CC β for sulfonamides and trimethoprim in milk were calculated. The capability of the method was confirmed on the basis of the established validation parameters, using spiked milk samples and "added – found" approach. The method was tested during the analysis of spiked samples of whole and powdered cow's milk (CV ~ 20%). The developed technique was verified by interlaboratory comparative testing of milk powder samples for sulfonamides content. The UPLC-MS/MS method for the determination of sulfonamides and trimethoprim residues in whole and milk powder samples can be used both for routine laboratory analysis of dairy products and for the examination of suspicious or questionable samples.

Keywords: SULFONAMIDES, RESIDUES, MILK, UPLC-MS/MS, INTERLABORATORY TESTING.

Сульфаніламіді – це синтетичні протимікробні препарати, похідні сульфанілової кислоти, що за спектром дії активні проти більшості грампозитивних та багатьох грамнегативних мікроорганізмів (стрептококів, стафілококів, пневмококів, кишкової палички, сальмонели, холерного вібріона), а також деяких найпростіших, (малярійного плазмодія, токсоплазми) (Campbell, 2002; Reeves, 2012). Узагальнена хімічна структура сульфаніламідів наведена на рис. 1, де R₁ і R₄ – це різні функціональні групи, додавання або заміщення яких веде до отримання сполук з різними фізичними, хімічними, фармакологічними та антибактеріальними властивостями.

Рис. 1. Хімічна структура препаратів групи сульфаніламідів.

Дія сульфаніламідів ілюструє принцип селективної токсичності, який базується на різниці перебігу метаболічних процесів у одноклітинних мікроорганізмів та вищих тварин, зокрема ссавців. Фолієва кислота критично важлива для розвитку клітин. Сульфаніаміди, як антиметаболіти, конкурують з пара-амінобензойною кислотою, що зупиняє синтез фолієвої кислоти. Вищі тварини мають декілька джерел постачання організму фолієвою кислотою – аліментарний та шляхом біосинтезу мікрофлорою кишечника. Одноклітинні організми, при потраплянні в клітину сульфаніламідів, втрачають єдину можливість забезпечення есенціальною фолієвою кислотою, що зупиняє їх розвиток та репродукцію (United States Pharmacopeia, 2007). Для підсилення дії сульфаніламідів їх часто поєднують з триметопримом, інгібітором ферменту дигідрофолат-редуктази, яка перетворює дигідрофолієву кислоту в активну кофермент-форму – тетрагідрофолієву кислоту, і таким чином, виникає подвійне метаболічне інгібування (Brogden et al., 1982).

Ці препарати були першими ефективними та доступними антибактеріальними засобами, які систематично застосовували у ветеринарній медицині для профілактики та лікування бактеріальних інфекцій для різних видів тварин у різних лікарських формах. Їх використовують для лікування продуктивних тварин, зокрема великої рогатої худоби, свиней, овець, коней, птиці, риби. Однак, неконтрольоване використання антимікробних речовин, у тому числі сульфаніламідів, не тільки призводить до зростання антибіотикорезистентності, але й може бути причиною потрапляння на споживчий ринок продукції, яка містить залишки цих препаратів, що є причиною алергічних реакцій або навіть небезпечних для життя проявів гіперчутливості (синдром Стівенса – Джонсона, токсичний епідермальний некроліз, агранулоцитоз, гемолітичну анемію, тромбоцитопенію, фульмінантний некроз печінки, гострий панкреатит) (Brumfitt et al., 1993; Isselbacher, 1994; United States Pharmacopeia, 2007; Podolsky, 2018).

Відповідно до Кодексу Аліментаріус (Codex Alimentarius, 2012) та Регламентом 37/2010/ЕС Європейського Союзу (European Council, 2010), затверджено біологічно обґрунтовані максимально допустимі рівні (МДР) вмісту залишкових кількостей сульфаніламідів на рівні 100 мкг/кг та для триметоприму – 50 мкг/кг у різних видах молока (коров'ячому, овечому, козячому) та тканинах продуктивних тварин (м'язи, жир, печінка, нирки). Урахування вищезгаданих нормативних актів, а також Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЕС (Commission Regulation, 2002) щодо основних критеріїв оцінки аналітичних методів та результатів, одержаних з їх використанням, є обов'язковим при розробці методик контролю, для забезпечення надійного захисту споживачів від надходження через продукти харчування тваринного походження залишків сульфаніламідів, які перевищуватимуть встановлені безпечні рівні. Методики повинні відповідати встановленим вимогам щодо чутливості, специфічності, експресності та ефективності, а також пройти усі етапи оцінки придатності для вищезазначених цілей.

Для визначення залишкових кількостей сульфаніламідів та триметоприму у продуктах харчування використовують скринінгові методи, зокрема, імуноферментний аналіз, та методи підтвердження: переважно – хроматографічні РХ-МС/МС або ВЕРХ-УФ/ФЛД (Gentili et al., 2005; Wang et al., 2006; Bayer et al., 2017). Метод ультрависокоєфективної рідинної хроматографії у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією (УЕРХ-МС/МС) найбільш ефективний для контролю вмісту залишків як заборонених речовин, так і зареєстрованих речовин при перевищенні максимального рівня їх у продуктах харчування тваринного походження, оскільки дає можливість одночасного виявлення цільових аналітів у найменших концентраціях з високою специфічністю та максимально задовольняє вимогам Рішення Європейської Комісії 2002/657/ЕС до підтверджуючих методів щодо кількості ідентифікаційних критеріїв (identification points) (Commission Decision, 2002).

Метою нашого дослідження була розробка, апробація та впровадження надійного, високочутливого та простого у виконанні УЕРХ-МС/МС методу для одночасного кількісного

визначення вмісту залишків сульфаніламідів та триметоприму у зразках цільного та сухого молока, а також перевірка придатності цього методу шляхом участі у міжлабораторних випробуваннях.

Матеріали і методи. *Реактиви.* Метанол (for HPLC, Sigma-Aldrich), вода високоочищена бідистильована (система Milli-Q, Millipore), форміатна кислота (Riedel-de-Haën), ацетонітрил (for HPLC, Sigma-Aldrich), етилацетат (for HPLC, Sigma-Aldrich), амоній гідрофосфат (Sigma-Aldrich), аміак (Riedel-de-Haën), гексан (for HPLC, Lab-Scan), тетрахлорметан (Pestiscan, Lab-scan).

Стандарти. Стандарти сульфагуанідину (SGD), сульфаніламиду (SAD), сульфадіазину (SDZ), сульфаметоксазолу (SMX), сульфатіазолу (STZ), сульфамеразину (SMR), сульфаметазину (SMZ), сульфаметоксипіридазину (SMP), сульфахлоропіридазину (SCP), сульфадиметоксину (SDM), триметоприму (TMP) (Sigma-Aldrich, Vetranal analytical standart).

Основні стандартні розчини кожного аналіту індивідуально готували з первинною концентрацією 1,0 мг/мл у метанолі. Наступні розчини індивідуальних стандартів сульфаніламідів та триметоприму з концентрацією 100, 10, та 1,0 мкг/мл готували послідовними розведеннями у метанолі, а 100 нг/мл та нижчі концентрації – у 0,1 % форміатній кислоті в 30 % розчині метанолу. Розчини стандартів зберігали впродовж двох місяців у щільно закритому посуді у холодильнику за температури 2-8 °C.

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. Цільне молоко попередньо знежирювали: центрифугували впродовж 10 хв за швидкості 4700 грм і температури 4 °C. Сухе молоко попередньо відновлювали: у поліпропіленову пробірку для центрифугування, об'ємом 15 мл зважували 1 г сухого молока, додавали 4 мл води і перемішували на вортексі до повного розчинення. У поліпропіленову пробірку для центрифугування об'ємом 15 мл вносили 2 мл молока, додавали 0,5 мл ацетонітрилу і 10 с струшували на вортексі. Пробірки витримували в ультразвуковій бані за кімнатної температури впродовж 10 хв, потім центрифугували впродовж 10 хв за швидкості 4700 грм і температури 4 °C. Надосадову рідину переносили у поліпропіленову пробірку для центрифугування об'ємом 50 мл, додавали 10 мл 0,1 М буферного розчину з рН 4 та перемішували на вортексі впродовж 1 хв. У пробірку додавали 12 мл етилацетату, струшували на роторному шейкері за швидкості 60 грм впродовж 20 хв і центрифугували впродовж 10 хв за швидкості 4700 грм і температури 4 °C. Відбирали 12 мл верхньої органічної фази та переносили у скляну пробірку для випаровування. Екстракти висушували до сухого залишку за температури 40 °C у роторному випарювачі, а сухий залишок перерозчиняли у 500 мкл 0,1 % розчину форміатної кислоти в 30 % метанолі і струшували на вортексі впродовж 20 с. Для знежирення додавали 1,5 мл суміші гексану з тетрахлорметаном (1:1) і струшували на вортексі впродовж 20 с. Далі зразки переносили у мікропробірки типу «епендорф» і центрифугували впродовж 5 хв за 21000 g і температури 4 °C. У віали для хроматографічного аналізу переносили 200 мкл нижньої фракції. Фактор концентрування – 3.

Параметри роботи 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 інжекції – 10 мкл. Температура колонки 40 °C. Час розділення – 2,5 хв.

Розділення проводили за таким градієнтом:

Час (хв)	Мобільна фаза А (% об./об.)	Мобільна фаза В (% об./об.)
0:00	75,0	25,0
0:09	75,0	25,0
0:10	5,0	95,0
0:75	5,0	95,0
0:80	75,0	25,0
2:00	75,0	25,0

Параметри роботи мас-спектрометричного детектора: іонне джерело – електро-розпилювач (ESI); режим іонізації – ES⁺; температура джерела (Source Temperature) – 150°C; температура висушування (Desolvation Temperature) – 600 °C; газ зіткнення (Collision Gas) – аргон; тиск аргону: 4.0×10^{-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 s; режим сканування мас – MRM (режим моніторингу множинних реакцій).

Параметри сканування мас аналітів наведено у табл. 1.

Визначення вмісту сульфаніламідів та триметоприму в зразках молока (мкг/кг) проводили згідно з калібрувальними графіками, побудованими на матриці зразка чистого контрольного молока, який за попередніми дослідженнями не містив цільових аналітів, використовуючи програмне забезпечення MassLynx V4.1.

Результати й обговорення. *Оптимізація умов роботи хроматографічної системи та МС/МС детектора.* Складність одночасного кількісного ВЕРХ-МС/МС визначення залишків сульфаніламідів зумовлена схожими елементами їх хімічної структури, і, як наслідок, тим, що при фрагментації молекулярного іона кожного з аналітів групи сульфаніламідів утворюються продукт-іони з однаковими значеннями m/z (92, 108 та 156 m/z) (Martins et al., 2015; Varenina et al., 2016). Тому при налаштуванні параметрів тандем-мас-спектрометричного детектора особливу увагу було приділено встановленню оптимальних умов отримання прекурсор-іонів сульфаніламідів – напруги на конусі (Cone Voltage) та точного значення m/z відповідно до молекулярної маси кожного аналіту. Також було прийнято рішення для кількісної оцінки вмісту сульфаніламідів та триметоприму враховувати у розрахунках по три іонних переходи (MRM) (табл. 1), що також відповідає вимогам Рішення 2002/657/ЕС щодо методів підтвердження (European Commission, 2002).

Щодо оптимальних умов хроматографічного розділення аналітів, то до складу основних компонентів мобільної фази (води та метанолу) було введено 0,1 % форміатної кислоти, оскільки ця сполука підсилює іонізацію речовин у режимі ES⁺ (Martins et al., 2015; Tamošiūnas et al., 2007; Unsal et al., 2018), а сульфаніламідів та триметоприм іонізуються саме в такому режимі. Присутність невеликої кількості форміатної кислоти також покращує форму хроматографічних піків аналітів (Martins et al., 2015; Unsal et al., 2018), що позитивно впливає на роздільну здатність хроматографічної системи, а отже, – і на селективність аналітичної методики.

Таблиця 1

Параметри сканування аналітів тандем-мас-спектрометричним детектором

Аналіт	Структура	Час виходу, хв	Прекурсор-іон, m/z	Продукт-іон, m/z	Напруга конуса (Cone), V	Енергія зіткнення (Collision Energy), V
SGD		0,23	215,2	92,0	22	24
				108,0		21
				156,0		13
SDZ		0,31	251,3	92,0	15	24
				108,0		22
				156,0		14
SMX		0,67	254,1	92,0	10	25
				107,9		23
				155,9		14
STZ		0,30	256,2	92,0	25	26
				108,0		22
				156,0		12
SMR		0,38	265,2	92,0	20	32
				107,7		24
				156,0		14
SMZ		0,50	279,2	92,0	14	28
				108,0		27
				186,0		16
SMP		0,53	281,2	92,0	18	28
				108,0		24
				156,0		14
SCP		0,63	285,2	91,9	10	30
				107,9		24
				155,9		14
SDM		0,79	311,2	92,0	32	32
				108,0		26
				156,0		20
SAD		0,24	156,0	67,0	52	22
				92,0		10
				108,0		8
TMP		0,42	291,2	123,0	48	22
				230,1		22
				261,1		22

Оптимізація процедури пробопідготовки зразків сухого та цільного молока. Для розробки підтверджуючого методу визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму у молоці, ми взяли за основу одну з розроблених нами схем пробопідготовки продуктів тваринного походження для УЕРХ-МС/МС визначення залишкових кількостей антибіотиків, а саме – м'яса (Yanovych et al., 2019), оскільки матриця молочних продуктів, як і м'яса, містить велику кількість білків та значний відсоток жиру. Присутність білків і пептидів різної природи потребує особливого підходу до пробопідготовки, зокрема, їх ефективного осадження, оскільки розчинні білки в екстракті проби можуть викликати суттєвий матричний ефект, погіршувати розділення фаз при екстракції аналітів органічними розчинниками та очистці проби, спотворювати аналітичний сигнал, а також спричиняти негативний вплив на хроматографічну колонку і, як наслідок, підвищувати загальний тиск у хроматографічній системі. Переважно при визначенні залишків ветеринарних препаратів у продуктах харчування хроматографічними методами необхідним та ефективним етапом очистки зразків є твердофазна екстракція (Gentili et al., 2005; Wang et al., 2006), як правило, – складна та ресурсозатратна процедура. Тому ми прийняли рішення застосовувати екстракцію в системі «рідина – рідина» як для очистки екстрактів зразків, так і для вилучення та концентрування аналітів, оскільки економічна ефективність є однією з критично важливих характеристик методики, призначеної для рутинного аналізу продуктів харчування тваринного походження на показники якості та безпеки.

Зважаючи на природу досліджуваних зразків, ми застосували попереднє осадження ацетонітрилом речовин білкової природи (Martins et al., 2015), а також ультразвукову інтенсифікацію для руйнування можливих сполук цільових аналітів з протеїнами молока (Gentili et al., 2005; Wang et al., 2006). Також слід зазначити, що відділення молочного жиру центрифугуванням при 4 °С перед відбором аліквоти зразка для аналізу теж дещо знижує вплив молочної матриці на абсолютний витяг аналітів і на матричні сигнали на хроматограмах підготовлених екстрактів зразків молока. Проте цей крок не є критично необхідним, і тому за потреби ним можна знехтувати, і таким чином, знизити затрати часу на пробопідготовку.

Наступним етапом процедури підготовки зразків молока, зазвичай, є переведення сульфаніламідів та триметоприму у середовище фосфатного буферного розчину з рН, близьким до нейтрального, оскільки це значення кислотності водного середовища є компромісним у мультианалітичних ВЕРХ-МС/МС методах для наступної ефективної екстракції органічними розчинниками переважної більшості антибактеріальних препаратів, зокрема сульфаніламідів, згідно з їх pK_a (Unsal et al., 2018). Водночас, саме рН ~ 7 є близьким до ізоелектричної точки більшості протеїнів (Kramarenko, 1995), що також сприяє переходу білків та пептидів в органічну фазу і, як наслідок, в екстракт зразка, який безпосередньо буде проходити процедуру хроматографічного аналізу. Натомість ми застосували фосфатну буферну суміш з рН ~ 4, оскільки наші дослідження показали, що за такого підходу краще відбувається розділення водної та органічної фаз, менша кількість білків переходить у цільовий екстракт, відповідно знижується матричний вплив на аналітичний сигнал, а також покращується загальний вигляд хроматограм зразків молока, форма піків аналітів, підвищується співвідношення «сигнал / шум».

Хоча за такого значення рН ступені вилучення екстракційною сумішшю аналітів, зокрема, триметоприму (Baere et al., 2000), із буферного розчину можуть бути дещо нижчими, ніж із нейтрального середовища, проте висока екстракційна здатність етилацетату з ацетонітрилом як допоміжним екстрагентом (Unsal et al., 2018), а також використання тандем-мас-спектрометричного детектора, забезпечують відмінний рівень чутливості визначення як досліджуваних сульфаніламідів, так і триметоприму в молоці.

Таким чином, нам вдалося покращити аналітичні характеристики мультианалітної методики практично без додаткових затрат часу та ресурсів на етапі пробопідготовки.

Валідаційні параметри розробленої методики. Для оцінки придатності розробленої УЕРХ-МС/МС методики одночасного кількісного визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму в зразках сухого та цільного молока, нами було проведено роботу щодо встановлення основних валідаційних параметрів методики, зокрема: межі детектування (LOD), межі кількісного визначення (LOQ), точності, відтворюваності, відсотка витягу (RP), межі прийняття рішення (ССα) та здатності виявлення (ССβ), межі лінійності калібрувальних графіків на матриці, коефіцієнтів кореляції отриманих лінійних залежностей (R^2). Дослідження було проведено з використанням калібрувальних графіків, побудованих на матриці молока, що дозволяє компенсувати ефекти підсилення чи пригнічення іонізації аналітів, як результати впливу матричних компонентів молока на аналітичний сигнал, а також чистих (контрольних) зразках коров'ячого молока, навантажених стандартним розчином суміші сульфаніламідів і триметоприму, для проведення досліджень за критерієм «введено – знайдено». Так, на рис. 2 наведено репрезентативні хроматограми підготованих екстрактів чистих зразків сухого молока, навантажених сульфаніламидами та триметопримом на рівні 5 мкг/кг, а на рис. 3 – приклади калібрувальних графіків, побудованих на матриці сухого молока в діапазоні концентрацій цільових аналітів від 0 до 10 мкг/кг.

Рис. 2. Хроматограми екстрактів сухого молока, навантажених сульфаніламидами та триметопримом на рівні 5 мкг/кг.

Рис. 3. Калібрувальні графіки для визначення сульфаніламідів та триметоприму в діапазоні концентрацій 0-10,0 мкг/кг, побудовані на матриці сухого молока.

Результати проведення валідації розробленої методики наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Валідаційні параметри розробленої УЕРХ-МС/МС методики визначення залишкових кількостей сульфаніламідів та триметоприму у молоці

Аналіт	LOD, мкг/кг	LOQ, мкг/кг	R ²	СС _α , мкг/кг	СС _β , мкг/кг	Введено 0,5 мкг/кг (n=6)			Введено 1,0 мкг/кг (n=6)		
						Знайдено, мкг/кг	RSD, %	RP, %	Знайдено, мкг/кг	RSD, %	RP, %
SGD	0,25	0,5	0,9986	109,6	121,0	0,535	8,1	102,1	0,982	9,8	101,9
SDZ	0,25	0,5	0,9993	107,7	124,0	0,482	8,8	101,4	1,074	6,8	99,8
SMX	0,1	0,25	0,9990	111,5	127,7	0,485	7,5	98,6	1,082	7,5	101,5
STZ	0,1	0,25	0,9994	102,6	115,9	0,504	7,0	100,8	1,044	7,0	101,0
SMR	0,1	0,25	0,9963	110,1	122,8	0,465	7,8	97,7	1,045	8,9	104,0
SMZ	0,1	0,25	0,9956	105,9	115,2	0,487	9,0	100,1	0,994	7,5	101,0
SMP	0,1	0,25	0,9993	104,6	117,1	0,493	6,7	99,0	1,003	6,9	100,4
SCP	0,1	0,25	0,9998	106,8	116,2	0,493	6,1	99,0	1,003	6,5	99,0
SDM	0,1	0,25	0,9983	103,7	121,3	0,496	6,7	99,2	1,004	6,5	102,6
SAD	0,25	0,5	0,9980	104,6	113,9	0,482	8,8	100,1	0,915	14,8	95,6
TMP	0,1	0,25	0,9988	51,4	56,7	0,492	5,6	93,2	1,019	7,0	98,7

Як видно з представлених даних, розроблена нами методика УЕРХ-МС/МС визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму в молоці, за чутливістю суттєво перевищує вимоги встановлених МДР за достатнього рівня прецизійності методики та відсотку витягу, що цілком узгоджується з вимогами Рішення 2002/657/EC (European Commission, 2002) щодо підтверджуючих методів. Одержані результати підтверджують придатність цієї методики для визначення вмісту залишків сульфаніламідів та триметоприму в сухому та цільному молоці при рутинному аналізі виробничими та контрольними лабораторіями.

Аналіз реальних зразків. Розроблену методику УЕРХ-МС/МС визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму апробовано при аналізі реальних та навантажених зразків сухого, знежиреного та цільного коров'ячого молока, причому у жодному з проаналізованих зразків не виявилось цільових аналітів.

Методику було верифіковано під час участі нашої лабораторії у раунді міжлабораторних випробувань «Визначення сульфаніламідних препаратів у сухому молоці», який проводила акредитована уповноважена національна референсна установа. Згідно з отриманими результатами, дослідний зразок містив залишки сульфадіазину на рівні, вищому, ніж встановлений МДР для молока, та ніж СС_β розробленої методики (табл. 3). Триметоприму та інших сульфаніламідів, що входять до переліку цільових аналітів, у зразку не було виявлено.

Таблиця 3

Результати участі Національної референс-лабораторії з контролю залишкових кількостей діючих речовин ветеринарних препаратів та кормових добавок у раунді міжлабораторних випробувань «Визначення сульфаніламідних препаратів у сухому молоці»

Зразки	Вміст SDZ, мкг/кг
X1	127,6
X2	131,1
X3	137,5
Σ	132,1
SD	5,0
RSD	3,8 %
Вміст SDZ, визначений акредитованою установою	147,7

Хроматограми екстрактів досліджуваного зразка молока та контрольного молока по загальному іонному струму (TIC) SDZ наведено на рисунку 4, а калібрувальний графік,

побудований на матриці сухого молока, який було використано для встановлення вмісту сульфадіазину в досліджуваному зразку, представлено на рисунку 5.

Рис. 4. Хроматограми екстрактів досліджуваного зразка молока та контрольного молока по загальному іонному струму (TIC) сульфадіазину.

Compound name: SDZ
 Correlation coefficient: $r = 0.998736$, $r^2 = 0.997473$
 Calibration curve: $204778 \cdot x + 25051.4$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

Рис. 5. Калібрувальний графік для визначення сульфадіазину, побудований на матриці сухого молока.

Згідно з висновками, зазначеними у звіті акредитованої установи, абсолютна різниця між двома результатами випробувань не перевищує межу збіжності, тому результати вважаються прийнятними. Міжлабораторна відтворюваність не перевищує нормативного значення ($< 23\%$), відповідно до Рішення Комісії 2002/657/EC.

Таким чином, розроблена методика УЕРХ-МС/МС визначення залишків сульфаніламідів та триметоприму в молоці пройшла успішну верифікацію, що підтверджує її

придатність для контролю як молочної сировини, так і готової продукції виробничими та контрольними лабораторіями.

ВИСНОВКИ

Розроблено та впроваджено методику одночасного визначення залишків десяти сульфаніламідних препаратів та триметоприму у сухому та цільному молоці високочутливим та високоселективним методом УЕРХ-МС/МС. Запропонована методика експресна і точна, причому не вимагає складної процедури пробопідготовки та дозволяє на належному рівні проводити контроль безпечності зразків молока. Результати валідації добре узгоджуються з вимогами Рішення 2002/657/ЄС щодо методів підтвердження. Методику було верифіковано за участі у відповідному раунді міжлабораторних випробувань.

Перспективи досліджень. Доповнення переліку аналітів, залишки яких можна визначати за допомогою розробленої УЕРХ-МС/МС методики в сухому та цільному молоці, іншими сульфаніламідними препаратами, які використовують у ветеринарії, без суттєвої модифікації процедури пробопідготовки та параметрів роботи хроматографічної системи.

References

Bayer, E.V., Novozhitskaya, Yu.N., Shevchenko, L.V., Mykhalska V.M. (2017). Determination of the content of antibiotics and sulfanilamide drugs in milk by screening method. *Ukrainian Journal of Ecology*. 7(4). 576–582. DOI: 10.15421/2017_163.

Brogden, R.N., Carmine, A.A., Heel, R.C., Speight, T.M., Avery, G.S. (1982). Trimethoprim: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use in urinary tract infections. *Drugs*. 23(6). 405–430. DOI: 10.2165/00003495-198223060-00001.

Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J.M. (1993). Reassessment of the rationale for the combinations of sulphonamides with diaminopyrimidines. *Journal of Chemotherapy*. 5(6). 465–469. DOI: 10.1080/1120009X.1993.1174109.

Campbell, K.L. (2002) Sulphonamides: Updates on use in veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*. 10(3). 205–215. DOI: 10.1046/j.1365-3164.1999.00181.x

CODEX ALIMENTARIUS (2012). Maximum residue limits for veterinary drugs in foods updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission, CAC/LMR 2.

De Baere, S., Baert, K., Croubels, S., De Busser, J., De Wasch, K., De Backer, P. (2000). Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Analyst*, 125. 409–415. DOI: 10.1039/a908750h

European Commission (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 14 august 2002 on implementing Council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results 2002/657/EC. *Official Journal of European Community*. L. 221, 8–36.

European Council (2010). Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Union*. L15. 1–72.

Gentili, A., Perret, D., Marchese, S. (2005). Liquid chromatography – tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(7). 705–733.

Isselbacher, K.J. (1994). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 13th Ed. McGraw-Hill Inc. P. 604.

Kramarenko, V.P. (1995). *Toxicological Chemistry (Handbook)*. Toksykologichna khimiya: Monografiya. Kyiv, Vyshcha Shkola. 423. [in Ukrainian].

Martins, M.T., Barreto, F., Barcelos Hoff, R., Jank, L., Bazzan Arsand, J., Correa Feijó, T., Scherman Schapoval, E.E. (2015). Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(3), 333–341. DOI: 10.1080/19440049.2015.1007091.

Podolsky, S.H. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*. 4. 124. DOI:10.1057/s41599-018-0181-x.

Reeves, P.T. (2012). Antibiotics: groups and properties. In: Wang, J., MacNeil, J.D., Kay, J.F. [Editors]. *Chemical analysis of antibiotic residues in food*. New Jersey, John Wiley & Sons, 44–45.

Tamošiūnas, V., Padaruskas, A., Babičienė, D., Petrėnas, T. (2007). High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides in eggs. *Chemija*, 18(3). 20–24.

United States Pharmacopeia (2007). *The National Formulary / USP 30/NF 25*. Rockville. United States Pharmacopeial Convention Inc. 3553.

Unsal, I.A., Tasan, M., Gokcen, T., Goren, A.C. (2018). Determination of sulfonamides in milk by ID-LC-MS/MS. *Journal of Chemical Metrology*, 12(1). 70–78. DOI: 10.25135/jcm.13.18.04.081.

Varenina, I., Bilandžić, N., Kolanović, B.S., Božić, Đ., Sedak, M., Đokić, M., Varga, I. (2016). Validation of a liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(4). 656–667. DOI: 10.1080/19440049.2016.1152569.

Wang, S., Zhang, H.Y., Wang, L., Duan, Z.J., Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *Food Additives & Contaminants*, 23(4). 362–384.

Yanovych, D.V., Zasadna, Z.S., Rydchuk, M.V., Plotycya, S.I. (2019). Simultaneous quantitative determination of the residues of amphenicols, metronidazole, sulfonamides, trimetoprim, tetracyclines and quinolones in meat samples by means of HPLC-MS/MS (Guidelines). *Odnochasne kilkisne vyznachennya zalyshkiv amfenikoliv, metronidazolu, sulfanilamidiv, trymetoprimu, tetratsykliniv ta khinoloniv u zrazkakh mjaca za dopomogoju VERKH-MC/MC (Nastanovy)*. Lviv, SCIVP. 20. [in Ukrainian].