



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92150** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61D 99/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 11321	(72) Винахідник(и): Новожицька Юлія Миколаївна (UA), Лінійчук Наталія Василівна (UA), Іванова Олена Вадимівна (UA), Ступак Оксана Михайлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.09.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.08.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.08.2014, Бюл.№ 15	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ І ВЕТЕРИНАРНО- САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ РЕЧОВИН В ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ МЕТОДОМ РХ/МС/МС

(57) Реферат:

Спосіб визначення залишкових кількостей антибактеріальних речовин у продукції тваринного походження, в якому для дослідження беруть 2 г підготовленого зразка, екстрагують за допомогою трихлороцтової кислоти, додають буфер, центрифугують і відбирають супернатант, екстракт очищують за допомогою заздалегідь прокондиціонованого патрона для твердофазної екстракції і випаровують в потоці азоту, після чого перерозчиняють в розчині мурашиної кислоти.

UA 92150 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема до біохімії та токсикології, і може бути використана в роботі науково-виробничих лабораторій.

Спосіб не має зареєстрованих аналогів в Україні.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки універсального та швидкого способу одночасного виявлення залишкових кількостей антибактеріальних речовин різних класів, а саме - амоксициліну, ампіциліну, пеніциліну, тилозину, еритроміцину, гентаміцину, ністатину, стрептоміцину, антибіотиків групи тетрациклінів (тетрациклін, хлортетрациклін, окситетрациклін, доксициклін), сульфаніламідних препаратів (сульфатіазол, сульфадиметоксин, сульфагуанідин, сульфадіазин, сульфамеразин, сульфаметазин, сульфаметоксипіридазин, сульфаметоксазол, сульфаніламід, дапсон) та фторхінолонів (енрофлоксацин, норфлоксацин) у продукції тваринного походження, суттєве скорочення часу на пробопідготовку, витрат реактивів, посуду, зменшення наважки проби та зниження собівартості способу.

Процедурний підхід до ідентифікації антибактеріальних речовин удосконаленим нами способом включає наступні елементи: для аналізу беруть $2 \text{ г} \pm 0,05$ (2 см^3) підготовленого, гомогенізованого зразка в центрифужну пробірку 15 см^3 , додають до нього 100 мм^3 20 % розчину трихлороцтової кислоти і змішують на вортексі, додають 5 см^3 міксованого буфера та екстрагують 10 хв. при 100 об./хв. на роторному змішувачі, центрифугують 10 хв. при 4700 об./хв. при температурі 4°C , відбирають супернатант у чисту пробірку на 15 см^3 , проводять твердофазну екстракцію за схемою: промивають картридж 3 см^3 метанолу, промивають 3 см^3 деіонізованої води, пропускають відібраний супернатант, промивають 3 см^3 деіонізованою водою, висушують картридж протягом 10 хв., елюють зразок 3 см^3 метанолу; випаровують під потоком азоту до легкого зволоження і перерозчиняють в 500 мм^3 10 % розчині мурашиної кислоти, екстракт переносять у віалку та проводять дослідження [1, 2].

Високоєфективний рідинний хроматограф із тандемним маселективним детектором готують згідно з інструкцією по експлуатації приладу.

Конфігурацію та режими роботи: хроматограф - Waters, колонка - C-18, 1,7 мкм, $50 \times 2,1$, електроспрей - ESI, полярність - позитивна, тиск газу аргон - 3,5 mTorr, температура колонки 40°C , об'єм інжекції - 20 мм^3 , режим введення проби автоматичний, витрата елюенту - $0,45 \text{ см}^3/\text{хв.}$, елюент - метанол: 0,01 % розчин мурашиної кислоти, час хроматографування - 6 хв.

Таблиця 1

Співвідношення градієнтів:

Час	A % (0,1 % розчин мурашиної кислоти)	B % (метанол)
0,00 хв.	100	0
1,0 хв.	100	0
2,00 хв.	60	40
3,0 хв.	20	80
5,5 хв.	10	90
6,0 хв.	100	0
6,5 хв.	100	0

Таблиця 2

Параметри введення даних для проведення досліджень на рідинному хромато-мас-спектрометрі

Компоненти	Материнський іон (m/z) $\pm 0,5$	Дочірні іони (m/z) $\pm 0,5$	Напруга на конусі	Напруга на капілярі
Стрептоміцин	581,8	246 263	65	40 35
Тилозин	916,3	174 772,2	38	40 24
Доксициклін	445,7	154 428	30	27 20
Тетрациклін	445,7	410 427,5	30	18 14
Окситетрациклін	460,8	426 443	30	18 15

Продовження табл. 2

Параметри введення даних для проведення досліджень на рідинному хромато-мас-спектрометрі

Компоненти	Материнський іон (m/z)±0,5	Дочірні іони (m/z)±0,5	Напруга на конусі	Напруга на капілярі
Хлортетрациклін	478,5	444 462	30	20 20
Пеніцилін	335	158 176	11	18 17
Амоксициклін	366	114 208	20	28 15
Еритроміцин	734,2	522,2 576,2	38	18 20
Норфлуксацин	319,6	233 276,2	35	25 16
Енрофлуксацин	359,8	286 342	35	34 21
Сульфадіазин	250,6	156,2 108,2	30	14 25
Сульфадиметоксин	310,6	156,2 108,2	33	19 25
Сульфаметазин	278,9	156,2 108,2	33	16 25
Сульфагуанідин	214,8	156,2 108,2	30	15 23
Сульфамеразин	264,8	156,2 108,2	33	16 25
Сульфаметоксазол	253,8	156,2 108,2	30	16 24
Сульфаметоксипіридазин	280,8	156,2 108,2	30	15 26
Сульфатіазол	255,8	156,2 108,2	30	15 25
Сульфаметр	280,9	156,2 108,2	30	15 25
Сульфаніламід	172,8	156,2 108,2	73	18 24
Ампіцилін	249,8	160,2 192,2	27	13 15
Дапсон	248,8	108,2 156,2	43	25 16
Гентаміцин	478,2	157,3 160,2	42	25 21
Ністатин	926,2	297,2 691,2	30	26 22

Таблиця 3

Валідаційні дані

№	Назва показника	ССа	ССβ	CV%
Молоко				
1.	Пеніцилін	1,19	2,07	24,1
2.	Амоксицилін	1,57	2,64	26,2
3.	Ампіцилін	1,9	2,9	25
4.	Стрептоміцин	128,8	221,17	19,4
5.	Гентаміцин	2,73	4,59	1,3
6.	Енрофлоксацин	11,5	19,39	2,7
7.	Норфлоксацин	13,98	21,32	8,3
Мед				
8.	Доксициклін	3,99	6,55	9,6
9.	Хлортетрациклін	2,84	4,5	8,6
10.	Тетрациклін	1,51	2,55	6,2
11.	Окситетрациклін	3,14	5,27	12
12.	Тилозин	6,09	9,02	16
13.	Еритроміцин	5,17	8,09	15,4
14.	Сульфатіазол	7,74	12,17	21,5
15.	Сульфаметоксипіридазин	3,15	5,21	10,1
16.	Сульфаметоксазол	3,8	6,66	15,2
17.	Сульфаметазин	3,79	6,59	17,9
18.	Сульфамеразин	4,45	7,88	19,5
19.	Сульфадиметоксин	3,82	6,5	15
20.	Сульфадіазин	4	7,08	14,7
21.	Сульфагуанідин	2,8	4,67	13
22.	Сульфаніламід	3,62	6,34	19,7
23.	Дапсон	1,15	2,15	11,5
24.	Ністатин	1,05	1,97	5,6

Таблиця 4

Максимально допустимий рівень по видах матриці відповідно до Регулювання Комісії ЕС № 37/2010 [3]

	М'язи, мкг/кг	Молоко, мкг/кг	Яйця	Печінка	Нирки
Пеніцилін	50	4	-	50	50
Тилозин	100	50	200	100	100
Амоксицилін	50	4	-	50	50
Ампіцилін	50	4	-	50	50
Стрептоміцин	500	200	-	500	1000
Рентаміцин	50	100	-	200	750
Тетрацикліни	100	100	200	300	600
Енрофлоксацин	100	100	-	200-300	200-300
Норфлоксацин	-	-	-	-	-
Сульфаніламідні препарати	100	100	-	100	100
Еритроміцин	200	40	150	200	200
Ністатин	-	-	-	-	-

- 5 Дані, наведені в табл. 3 і табл. 4, свідчать про те, що даний спосіб є досить чутливим, щоб детектувати дані речовини. Так, як у відношенні сполук, для яких встановлена максимально-допустимий рівень (МДР), показник ССβ повинен бути менше чи дорівнювати МДР. Відповідно, показник ССа повинен бути менше [4, 5].

Наш спосіб дозволяє за досить короткий проміжок часу дослідити зразок на одночасно багато показників різних класів, що значно економить час, реактиви, і в свою чергу знижує собівартість дослідження.

Спосіб "Визначення антибактеріальних речовин в продукції тваринного походження методом РХ/МС/МС" дозволяє визначати залишкову кількість амоксициліну, ампіциліну, пеніциліну, тилозину, еритроміцину, гентаміцину, ністатину, стрептоміцину, антибіотиків групи тетрациклінів (тетрациклін, хлортетрациклін, окситетрациклін, доксициклін), сульфаніламідних препаратів (сульфатіазол, сульфадиметоксин, сульфагуанідин, сульфадіазин, сульфамеразин, сульфаметазин, сульфаметоксипіридазин, сульфаметоксазол, сульфаніламід), дапсону та фторхінолонів (енрофлоксацин, норфлоксацин) в продуктах тваринного походження та продуктах їх переробки.

Спосіб визначення включає три основні етапи:

- екстракція залишків амоксициліну, ампіциліну, пеніциліну, тилозину, еритроміцину, гентаміцину, ністатину, стрептоміцину, антибіотиків групи тетрациклінів, сульфаніламідних препаратів, дапсону та фторхінолонів за допомогою трихлороцтової кислоти;

- очищення екстракту шляхом твердофазної екстракції;

- ідентифікація та кількісне визначення методом РХ/МС/МС.

Кількісне визначення масової концентрації антибактеріальних речовин проводять способом зовнішнього стандарту за здійсненням попередньо калібруванням хроматографа за градувальними розчинами. Ідентифікацію проводять за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності.

Підготовка проби

Для підготовки проби потрібно відібрати достатню кількість зразка не менше 100 г, ретельно гомогенізувати.

1. Екстракція:

- для аналізу взяти $2 \text{ г} \pm 0,05$ (2 см^3) підготовленого, гомогенізованого зразка в центрифужну пробірку на 15 см^3 ;

- додати 100 мм^3 20 % розчину трихлороцтової кислоти та екстрагувати 10 хв. при 100 об./хв. на роторному змішувачі;

- додати 5 см^3 міксованого буферу;

- центрифугувати 10 хв. при 14000 g при температурі 4°C ;

- відібрати супернатант.

2. Твердофазна очистка:

Підготовка картриджів для очистки:

- промити 3 см^3 метанолу;

- промити 3 см^3 деіонізованою водою;

- пропустити відібраний супернатант;

- промити 3 см^3 деіонізованою водою;

- висушити картридж протягом 10 хв.;

- елювати зразок 3 см^3 метанолу.

Випаровуємо під потоком азоту до легкого зволоження. Перерозчиняємо в 500 мм^3 0,1 % мурашиної кислоти. При необхідності профільтрувати через шприцевий фільтр 0,45 цм.

Перенести екстракт у віалку та проводити дослідження.

Виконання вимірювань та обчислення результатів

Для градування хроматографа двічі аналізують кожний з градувальних розчинів та визначають площі піків. Отримані результати обраховують за методом найменших квадратів, який дозволяє обчислити коефіцієнти а і b градувальної прямої виду $y=a+bx$:

$$a = \frac{(\sum y - b \sum x)}{mn}; \quad b = \frac{mn \sum x \sum y}{mn \sum x^2 - (\sum x)^2},$$

де:

x - концентрація речовини, що визначається, нг/см^3 ;

y - відгук (площа піку) речовини, що визначається;

m - кількість градувальних сумішей;

n - кількість спостережень;

Обчислення абсолютного процента повернення:

$$X = \frac{C \cdot 100}{c},$$

де: X - абсолютний процент повернення, %;

C - концентрація аналіту, отримана по градувальному графіку, нг/см^3 ,

c - концентрація аналіту, додана до аналізованого зразка, нг/см³.

Перевіряють працездатність системи, щоб гарантувати, що вона функціонує задовільно. Перевіряють базову лінію сигналу детектора. Шумова смужка повинна бути стабільною, без різких коливань і сторонніх піків. Якщо є відхилення, то проводять промивку хроматографічної системи, обслуговування системи детектора, зміну складових рухливої фази.

Перевіряють контроль відхилення часу утримання та площі піка контрольного розчину. Для цього інjektують контрольний розчин суміші антибактеріальних речовин. Встановлюють час утримання, визначають площу. Значення RSD для площі піка і часу утримання не повинно перевищувати 2,5 %.

Найнижчий рівень калібрування повинен бути таким, щоб забезпечувати підтвердження, що відгук є адекватним і гарантувати, що подана у звіті межа була досягнута і щоб помилкові нульові значення не були подані в звіті.

Іони, які враховуються, повинні мати сигнал більше 3 відносно до шуму.

Максимально дозволені відхилення для відносної інтенсивності в області техніки спектрометричного визначення маси:

Відносна інтенсивність (% основного збагачення)	LC-MS-MS (відносні)
> 50 %	± 20 %
> 20-50 %	± 25 %
> 10-20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

При аналізі LC-MS/MS повинні бути передбачені матричні ефекти. Матричні ефекти роздільються як пригнічення або збільшення відповіді сигналу. Матричні ефекти виникають, як правило, із-за присутності матричних елементів, які впливають на іонізацію речовин. Це впливає на кількісне виявлення та точність результатів.

Джерела інформації:

1. Delepine B. Multi-residue method for screening of Antibiotics Residues in Meat using liquid chromatography tandem mass spectrometry / B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, M. Juhel-Gaugain // AFSSA-FOUGERES, Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants, Laboratoire National de Référence.

2. Van Rhijn J.A. RIKILT Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands Waters Corp. MS Technologies Centre, Manchester, UK - Advanced multi-residue screening in veterinary drug analysis using UPLC - ToF MS / Van Rhijn J.A. C. Bourgeon, J.J. Lasaroms, E. Oosterink, D. McMillan // RIKILT Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands Waters Corp. MS Technologies Centre, Manchester, UK

3. Commission Regulation (EU) № 37/2010 // Official journal of the European Commission. - 2010. - L 15. - 72 p.

4. Commission Decision 2002/657/EC // Official journal of the European Commission. - 2002. - L 221. - 8 p.

5. Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC, European Commission helh & consumer protection Directorate-General, Directorate E - Safety of the Food Chain, SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення залишкових кількостей антибактеріальних речовин у продукції тваринного походження, в якому для дослідження беруть 2 г підготовленого зразка, екстрагують за допомогою трихлороцтової кислоти, додають буфер, центрифугують і відбирають супернатант, екстракт очищують за допомогою заздалегідь прокондиціонованого патрона для твердофазної екстракції і випаровують в потоці азоту, після чого перерозчиняють в розчині мурашиної кислоти.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601