

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА В КУРИНЫХ ЯЙЦАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.А. Луговской¹, Д.С. Большаков², Т.Б. Никешина³

¹ ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lugovskoy@arriah.ru

² старший научный сотрудник, кандидат химических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: bolshakov@arriah.ru

³ заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: nikeshina@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Разработана методика одновременного определения 9 антибиотиков фторхинолонового ряда (марбофлоксацина, офлоксацина, пефлоксацина, норфлоксацина, цiproфлоксацина, энрофлоксацина, данофлоксацина, сарафлоксацина и дифлоксацина) в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. Диапазон определяемых содержаний фторхинолонов составил от 10 до 100 мкг/кг при массе образца 4 г. В результате валидационных исследований рассчитаны суммарная стандартная неопределенность и относительная расширенная неопределенность аналитических измерений. Методика позволяет определять остаточные содержания антибиотиков на уровне допустимых значений 100 мкг/кг в соответствии с СанПиН 2.3.2.2804-10 и «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)».

Ключевые слова: фторхинолоны, антибиотики, куриные яйца, высокоэффективная жидкостная хроматография, флуориметрическое детектирование, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF FLUOROQUINOLONE DETECTION METHOD IN CHICKEN EGGS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.A. Lugovskoy¹, D.S. Bolshakov², T.B. Nikeshina³

¹ Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: lugovskoy@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Sciences (Chemistry), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: bolshakov@arriah.ru

³ Head of the Laboratory, Candidate of Sciences (Biology), FGBI «ARRIAH», Vladimir, e-mail: nikeshina@arriah.ru

SUMMARY

The method for the simultaneous detection of nine fluoroquinolone antibiotics (marbofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin and difloxacin) in chicken eggs using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection was developed. The detected range of fluoroquinolones is from 10 to 100 µg/kg in a 4 g sample. Based on the validation studies the combined standard uncertainty and relative expanded uncertainty were calculated. The technique enables to detect antibiotic residues in their admissible levels equal to 100 µg/kg, in compliance with SanPiN 2.3.2.2804-10 and Common sanitary-epidemiological and hygienic requirements to the goods subject to sanitary and epidemiological surveillance (control).

Key words: fluoroquinolones, antibiotics, chicken eggs, high-performance liquid chromatography, fluorescence detection, validation.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время антибиотики широко используются в животноводстве для лечения и профилактики различных заболеваний сельскохозяйственных животных, а также в качестве кормовых добавок для увеличения их массы тела. Наличие остаточных количеств антибактериальных препаратов в продуктах питания животного происхождения представляет серьезную опасность для здоровья человека за счет проявления ярко выраженных токсических и аллергических свойств. Их нормирование на территории Российской Федерации осуществляется в соответствии с СанПиН 2.3.2.2804-10 «Дополнения и изменения № 22 к СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» (Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 27.12.2010 г. № 177), а также «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» (утверждены Решением Комиссии Таможенного союза № 299 от 28.05.2010 г).

Фторхинолоны (ФХ) являются растущей группой синтетических антибиотиков, используемых для лечения различных инфекционных заболеваний в медицине и ветеринарии. ФХ относятся к хинолонам второго поколения: их основное отличие заключается в наличии атома фтора в положении С-6 хинолонового фрагмента и/или пиперазинового кольца в положении С-7 (рис. 1), что повышает их общую антибактериальную активность.

В соответствии с действующей нормативной документацией, антибиотики в продуктах животного происхождения определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА) [3, 5], микробиологическими [1, 4, 8] и хроматографическими [2, 6, 7, 9] методами. При использовании ИФА и проведении микробиологических исследований возможно качественное определение (обнаружение) пенициллинов, тетрациклинов, цефа-

лоспоринов, макролидов, β-лактамов и левомицетина (хлорамфеникола). Однако эти методы недостаточно специфичны, могут давать ложноположительные результаты, а продолжительность анализа достигает нескольких часов.

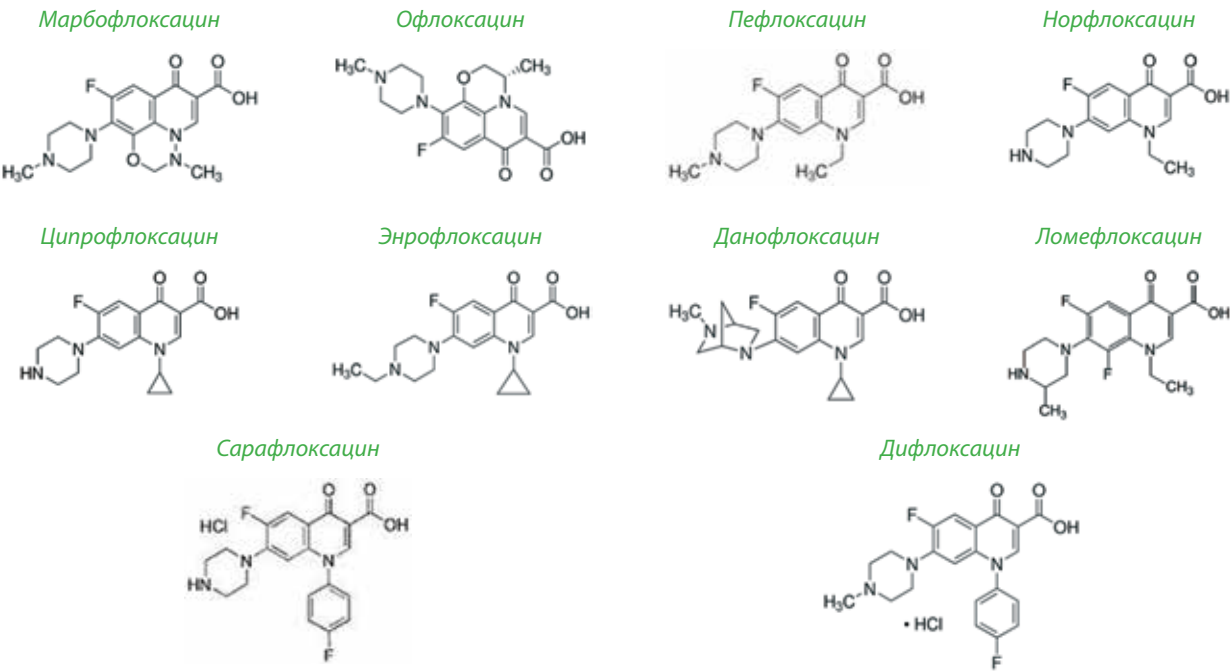
Для оценки количественного содержания антибиотиков в пищевых продуктах используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием [2, 6, 7, 9]. Существенным недостатком данного метода, ограничивающим его повсеместное использование, является высокая стоимость оборудования, расходных материалов и жесткие требования к качеству реактивов.

Для определения ФХ используют прежде всего хроматографические, реже электрофоретические методы. Анализ цельной крови [18], биологических жидкостей [14, 17, 19, 22], воды [20, 21, 23] проводят методом ВЭЖХ с УФ- [19, 22, 23], фотодиодноматричным [18], флуориметрическим [20–22] детектированием, детектированием с фотоиндуцированной флуоресценцией [17] после извлечения, концентрирования и очистки экстрактов методом твердофазной (ТФЭ) [20, 23], жидкостно-жидкостной экстракции [14] и твердофазной микроэкстракции [21]. С использованием метода капиллярного электрофореза проводят анализ молока [13], куриного мяса [12], воды [15] и биологических жидкостей [10, 11, 16]. Предложенные методики позволяют определять от 1 до 5 антибиотиков при совместном присутствии.

Цель данной работы состояла в разработке методики одновременного определения 9 антибиотиков фторхинолонового ряда (с использованием ломефлоксацина в качестве внутреннего стандарта) в куриных яйцах и оценки ее пригодности для применения в программе мониторинга остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах.

Для достижения поставленной цели выбран метод ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием, который не только широко распространен в лабораторной практике, но и имеет высокую чувствительность при проведении исследований. Концентрирование

Рис. 1. Структурные формулы определяемых антибиотиков фторхинолонового ряда



и очистку экстрактов проводили методом ТФЭ, позволяющим эффективно устранять мешающее влияние компонентов матрицы без использования большого количества органических растворителей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. В работе использовали жидкостные хроматографы Agilent LC 1200 (Agilent Technologies) и Flexar PDA FLD (PerkinElmer) с диодно-матричным и флуориметрическим детекторами, оснащенные программным обеспечением (ПО) Agilent ChemStation и Chromera соответственно. Разделение проводили на колонке SunFire C18 (3×100 мм; 3,5 мкм) с предколонкой SunFire C18 (3×20 мм; 3,5 мкм).

В процессе подготовки проб использовали ультрацентрифугу Mini Spin (Eppendorf, Германия), низкоскоростную центрифугу Rotanta 460R (HETTICH, Германия), лабораторный pH-метр-милливольметр «pH-121» (Россия), шейкер Vibromax 110 (Heidolph, Германия), программируемый ротатор Multi RS-60 (Biosan, Латвия) и универсальный водный термостат BTW-U (Biosan, Латвия).

Реагенты и материалы. В работе применяли индивидуальные стандартные образцы следующих антибиотиков: марбофлоксацин (34039-100MG-R Vetranal), офлоксацин (33703-100MG-R Vetranal), пефлоксацин (C15905000 Dr Ehrenstorfer), норфлоксацин (33899-100MG-R Vetranal), цiproфлоксацин (33434-100MG-R Vetranal), энрофлоксацин (33699-100MG-R Vetranal), данофлоксацин (33700-100MG-R Vetranal), сарафлоксацин (33497-100MG-R Vetranal), дифлоксацин (33984-100MG-R Vetranal) и ломефлоксацин (L2906-1G Sigma) в качестве внутреннего стандарта.

Для приготовления подвижной фазы, буферных растворов и проведения пробоподготовки исполь-

зовали ацетонитрил (Криохром), метанол (Sharlau), тетрагидрофуран (ТГФ) (Roth), дихлорметан (ДХМ) (Panreac), изопропиловый спирт (ИПС) (Panreac), гексан (LiChrosolv), стандарт-титры серной кислоты (ЗАО НПП «Уралхиминвест»), фосфат калия монозамещенный (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich), фосфат калия двузамещенный (K_2HPO_4) (Sigma-Aldrich), фосфорную кислоту (Fluka), перхлорат лития (Fluka), этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль (ЭДТА) (Fluka), гидроксид калия (Panreac), деионизированную воду с удельным сопротивлением не менее 18 МОм·см. Для проведения твердофазной экстракции применяли картриджи Oasis MAX (3 cc 60 mg) и Oasis HLB (3 cc 60 mg) (Waters).

Приготовление стандартных растворов. Стандартный раствор смеси 9 ФХ с концентрацией 50 мкг/мл готовили растворением точных навесок 5 мг каждого из антибиотиков в 100 мл метанола. Для лучшего растворения к раствору добавляли 200 мкл 20%-ного раствора гидроксида калия. Стандартный раствор ломефлоксацина с концентрацией 200 мкг/мл, используемый в качестве внутреннего стандарта, готовили отдельно растворением точной навески 20 мг в 100 мл метанола. Полученные растворы хранили в холодильнике при +4°C.

Рабочие растворы смеси 9 ФХ и ломефлоксацина концентрацией 1,0 и 1,6 мкг/мл соответственно готовили в день проведения исследований разбавлением аликвоты исходного раствора в 10 мМ калий-фосфатном буферном растворе (КФБ) pH 2,5.

Пробоподготовка. В центрифужную пробирку вместимостью 50 мл вносили навеску гомогенизированной пробы куриных яиц массой 4,0 г. В контрольную пробу массой 4,0 г добавляли рабочий раствор 9 ФХ до концентрации 25 мкг/кг. В подготовленные пробы вносили рабочий раствор внутреннего стандарта ломефлоксацина до концентрации 40 мкг/кг. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и оставляли на 10–15 мин. По истечении времени в исследуемые пробы вносили по 200 мкл 0,1 М раствора ЭДТА, 4 мл метанола, перемешивали в течение 5 мин на шейкере. В каждую пробирку добавляли до 20,0 г (по весу) 10 мМ КФБ pH 7,5, содержащий 0,1% ЭДТА. Пробу перемешивали на ротаторе в течение 15 мин, центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтровальную бумагу со средним диаметром пор. Аликвоту фильтрата 3,0 мл использовали для проведения ТФЭ-очистки.

Рис. 2. Хроматограмма стандартной смеси антибиотиков фторхинолонового ряда: 1 — марбофлоксацин, 2 — офлоксацин, 3 — пефлоксацин, 4 — норфлоксацин, 5 — цiproфлоксацин, 6 — ломефлоксацин (внутренний стандарт), 7 — энрофлоксацин, 8 — данофлоксацин, 9 — сарафлоксацин, 10 — дифлоксацин, концентрация каждого компонента 25 нг/мл (концентрация ломефлоксацина 40 нг/мл) (ПО «Agilent ChemStation», длина волны возбуждения 285 нм, эмиссии 495 нм)

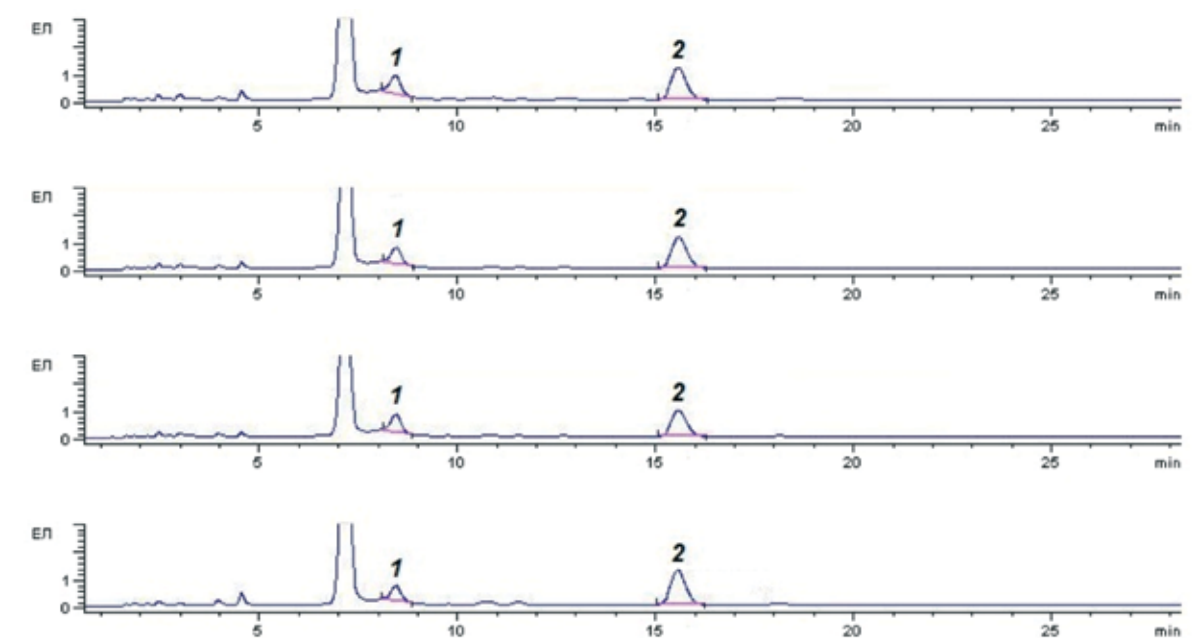
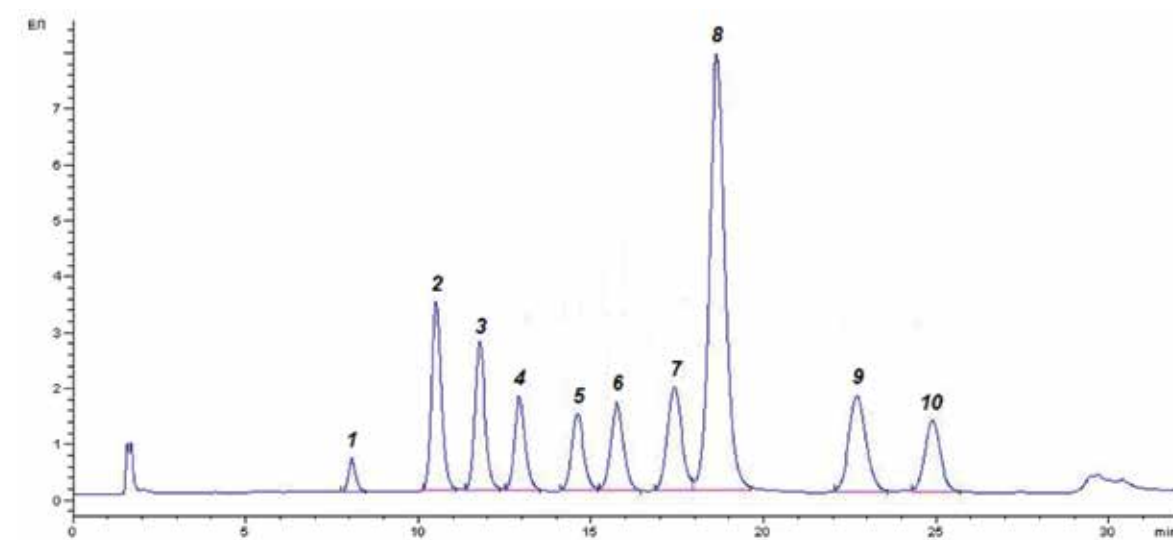


Рис. 3. Хроматограммы экстрактов холостых матричных проб яиц: 1 — компонент матрицы; 2 — ломефлоксацин (внутренний стандарт) (ПО «Agilent ChemStation», длина волны возбуждения 285 нм, эмиссии 495 нм)

Проведение твердофазной экстракции. Подготовку картриджа Oasis MAX (3 cc 60 mg) осуществляли последовательным промыванием смесью ТГФ – 1 н серная кислота (1:1) (4×0,5 мл), ТГФ (2×1 мл), деионизированной водой (2×1 мл) и 10 мМ КФБ pH 7,5, содержащим 0,1% ЭДТА (4×1 мл). Затем вносили 3,0 мл экстракта. Картридж промывали 10 мМ КФБ pH 7,5, содержащим 0,1% ЭДТА (4×0,5 мл), деионизированной водой (4×0,5 мл), не допуская высыхания сорбента. Элюирование антибиотиков с картриджа в пенициллиновые флаконы проводили смесью ТГФ – 0,06 н серная кислота (1:1) (4×0,5 мл). Перед смывом в каждый флакон добавляли по 1 мл буферного раствора Мак-Иллвейна pH 4,6. Избыток ТГФ удаляли в токе воздуха в течение 20–30 мин при 40°C.

Полученный после первой стадии ТФЭ экстракт концентрировали на картриджах Oasis HLB (3 cc 60 mg). Активацию и кондиционирование сорбента проводили последовательным промыванием смесью ДХМ – ИПС (80:20) (4×0,8 мл), метанолом (2×0,8 мл) и деионизированной водой (3×1 мл). После чего вносили пробу (около 1,5 мл), промывали картридж деионизированной водой (3×1 мл) и гексаном (2×1 мл). Сорбент высушивали в вакууме в течение 3 мин. Антибиотики элюировали смесью ДХМ – ИПС (80:20) (4×0,8 мл). Растворитель удаляли в токе воздуха при 40°C, сухой остаток растворяли в 0,5 мл 10 мМ КФБ pH 2,5. Экстракт центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин и проводили хроматографическое разделение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Условия хроматографического разделения. В настоящей работе представлена методика определения 9 антибиотиков хинолонового и фторхинолонового ряда и ломефлоксацина, который использовали в качестве внутреннего стандарта, в яйцах кур. По своей природе антибиотики этого класса имеют сходное строение молекулы и близки по своим физико-химическим свойствам, поэтому подбор условий для их полного хроматографического разделения не является простой за-

дачей. Кроме того, важно не только получить полное разделение анализируемых соединений, но и отделить их от возможных эндогенных компонентов матрицы исследуемой пробы. Способность антибиотиков этой группы к флуоресценции под воздействием возбуждающего излучения дает дополнительное преимущество при разработке методики.

На стандартных смесях ФХ оптимизированы условия их разделения. При использовании хроматографической колонки с обращенной фазой C18 (3×100 мм, 3,5 мкм) с предколонкой (3×20 мм, 3,5 мкм) оптимальной является скорость потока 0,45 мл/мин при температуре термостатирования 20°C. В качестве подвижной фазы А использовали 10 мМ раствор KH_2PO_4 pH 2,5, содержащий 50 мМ перхлората лития и 20 масс.% метанола. Подвижная фаза Б состояла из 80 об.% раствора ацетонитрила. Элюирование проводили 17 мин в изократическом режиме в соотношении подвижной фазы А и Б (96:4) с последующим повышением концентрации фазы Б до 12% к 25 мин. По окончании хроматографического разделения колонку промывали 5 мин при соотношении фаз А и Б (1:1), затем состав подвижной фазы возвращали к первоначальным условиям.

Аналитический сигнал регистрировали с помощью флуориметрического детектора на длине волны возбуждения 285 нм и длине волны эмиссии 495 нм. При длинах волн возбуждения 285 нм и эмиссии 450 нм, которые рекомендуют в научной литературе, интенсивность флуоресцентного сигнала выше, однако при этом уменьшается чувствительность определения марбофлоксацина и офлоксацина. Кроме того, в работе не использованы некоторые антибиотики хинолонового и фторхинолонового ряда, такие как эноксацин, флулекин, налидиксовая и оксолиновая кислоты, которые не обладают способностью к флуоресценции. На рис. 2 представлена хроматограмма стандартного раствора смеси ФХ концентрацией 25 нг/мл (концентрация ломефлоксацина 40 нг/мл), полученная в оптимальных условиях.

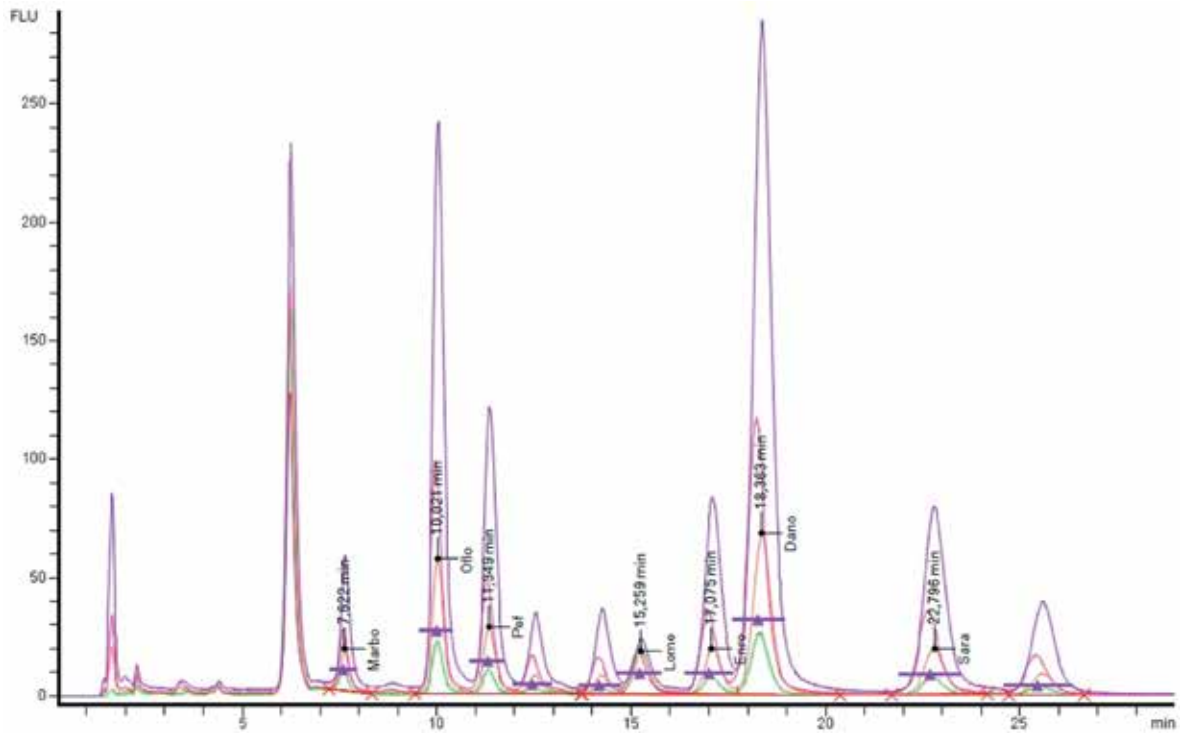


Рис. 4. Хроматограммы экстрактов холостой матричной пробы яиц с добавками фторхинолонов на уровне 10, 25, 50 и 100 мкг/кг (ПО «Chromera»)

Влияние матрицы (селективность-специфичность). Для аналитической методики важна способность «отличать» целевой антибиотик от близкородственных соединений, присутствующих в материале матрицы. Поэтому подходящие образцы холостого материала матрицы исследовали до и после обогащения на целевом уровне в соответствии с методикой. В приложении № 5 к Техническому регламенту Таможенного союза ТР ТС 034/2013 целевым считают содержание антибиотиков фторхинолонового ряда на уровне 0,1 мг/кг (100 мкг/кг). Однако при этом оговаривают, что данный уровень достигается по суммарному содержанию антибиотиков этой группы в материале исследуемой пробы. Поэтому исследования по влиянию эндогенных компонентов матрицы на способность обнаружения антибиотиков фторхинолоновой

группы в пищевой продукции проводили на целевом уровне 25 мкг/кг.

Для проведения таких исследований пробы пищевых продуктов, поступающие в лабораторию химического анализа Испытательного центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», обогащали антибиотиками фторхинолонового ряда на целевом уровне 25 мкг/кг и анализировали в соответствии с разрабатываемой методикой. Результаты исследований яиц кур представлены на рис. 3. Полученные результаты указывают на отсутствие матричного эффекта при исследовании на остаточное содержание фторхинолонов (марбофлоксацин, офлоксацин, пefлоксацин, норфлоксацин, ципрофлоксацин, ломефлоксацин, энрофлоксацин, данофлоксацин, сарафлоксацин и дифлоксацин) в яйцах кур на целевом уровне 25 мкг/кг.

Получение основных валидационных характеристик. Общая схема валидационных исследований методики состояла в проведении 4 серий экспериментов с 4 повторами внутри серии для каждой из 4 концентраций аналитов (10, 25, 50 и 100 мкг/кг). Исследования проводили двое сотрудников, каждый из которых проводил по две серии экспериментов. В качестве валидационных стандартов использовали образцы куриных яиц, которые не содержали антибиотики фторхинолонового ряда (ниже предела обнаружения методики) по результатам предварительных исследований. Для подтверждения специфичности методики исследовали не менее 20 холостых матричных проб. Из таких проб готовили объединенный валидационный стандарт, который хранили в холодильнике при +4°C на время проведения исследования. В соответствии с описанной выше процедурой подготовки проб, валидационный стандарт обогащали до концентрации ФХ 10, 25, 50 и 100 мкг/кг (рис. 4).

По каждому антибиотику строили объединенные калибровочные кривые, характеристики которых пред-

Таблица 1
Характеристики калибровочных кривых фторхинолонов

Антибиотик	Уравнение калибровочной кривой	R ²
Марбофлоксацин	$y = 4,44296E-01x + 2,13171E-01$	0,97453217
Офлоксацин	$y = 2,96125E+00x + 2,09420E-01$	0,99029075
Пефлоксацин	$y = 1,69062E+00x + 1,26341E-01$	0,98726623
Норфлоксацин	$y = 5,25903E-01x + 1,00201E-01$	0,98402010
Ципрофлоксацин	$y = 5,45804E-01x + 7,60135E-02$	0,97131268
Ломефлоксацин	$y = 1,47528E+04$	0,97681878
Энрофлоксацин	$y = 1,57926E+00x + 1,23286E-01$	0,98528659
Данофлоксацин	$y = 6,16812E+00x + 3,28236E-01$	0,99122949
Сарафлоксацин	$y = 2,14519E+00x + 8,32236E-02$	0,98722683
Дифлоксацин	$y = 1,02848E+00x + 2,48830E-02$	0,98737302

ставлены в табл. 1. Наиболее пригодной функцией для калибровочной кривой оказалась линейная регрессионная модель со взвешиванием 1/x по аргументу «содержание антибиотика в пробе». Для ломефлоксацина, который является внутренним стандартом, калибровочная кривая строилась по одной концентрации 40 мкг/кг, и ее характеристики заданы лишь углом наклона.

Расчеты валидационных характеристик проводили по следующей ниже схеме.

1. Вариация повторяемости внутри серии экспериментов рассчитана по формуле:

$$S_r^2 = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n \frac{(z_{ij} - \bar{z}_i)^2}{p(n-1)} \quad \bar{z}_i = \sum_{j=1}^n \frac{z_{ij}}{n},$$

где $\bar{z}_i$ — среднее арифметическое значение измерения внутри серии i;
 z_{ij} — единичное значение измерения внутри серии i.

2. Вариация повторяемости между сериями экспериментов вычислена по формуле:

$$S_b^2 = \left\{ \sum_{i=1}^p \frac{(\bar{z}_i - \bar{z})^2}{p-1} \right\} - \left(\frac{S_r^2}{n} \right); \quad \bar{z} = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n \frac{z_{ij}}{pn},$$

где $\bar{z}$ — общее среднее значение измерения внутри и между сериями экспериментов.

3. Вариация промежуточной прецизионности оценена по формуле:

$$S_{ip}^2 = S_r^2 + S_b^2.$$

4. Неопределенность измерения, связанная со смещением методики, рассчитана по формуле:

$$S_\delta^2 = \frac{\left[S_{ip}^2 - \left(1 - \frac{1}{n} \right) S_r^2 \right]}{p}.$$

Расчет неопределенности. Для того чтобы оценить неопределенность, связанную с результатом измерений, все данные, использованные при построении калибровочных кривых, обрабатывали повторно. При этом валидационные стандарты с добавками считали пробами с неизвестным содержанием антибиотиков. Пересчитанные таким образом величины содержания показывают разброс экспериментальных данных от их фиксированного значения и позволяют оценить суммарную стандартную неопределенность измерений u(Y) и относительную расширенную неопределенность измерений U(Y) по формулам:

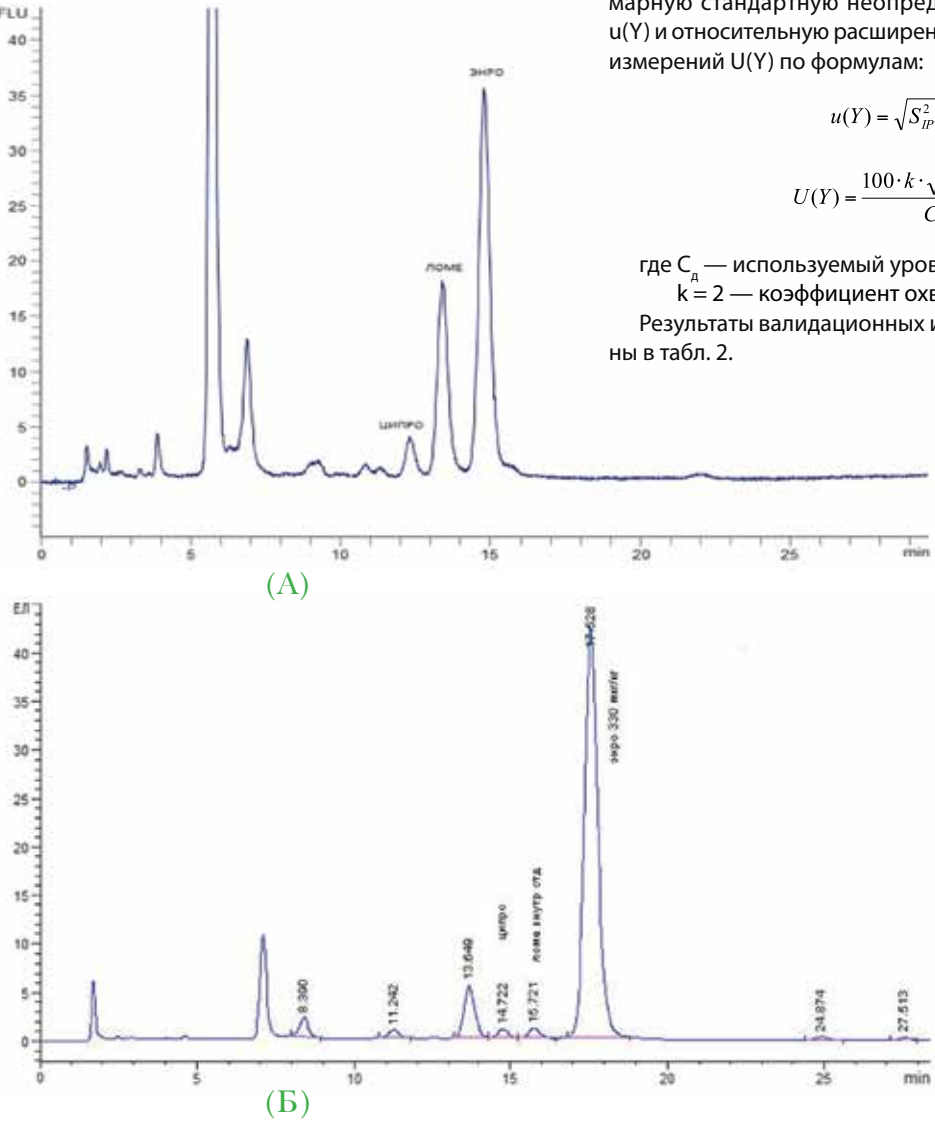
$$u(Y) = \sqrt{S_{ip}^2 + S_\delta^2};$$

$$U(Y) = \frac{100 \cdot k \cdot \sqrt{S_{ip}^2 + S_\delta^2}}{C_d},$$

где C_d — используемый уровень добавки;
 $k = 2$ — коэффициент охвата.

Результаты валидационных исследований приведены в табл. 2.

Рис. 5. Хроматограммы экстрактов куриных яиц, содержащих энрофлоксацин и ципрофлоксацин в концентрации 40 и 10 мкг/кг (А), 330 и 40 мкг/кг (Б) соответственно (лосефлоксацин является внутренним стандартом) (А — ПО «Agilent ChemStation»; Б — ПО «Chromera»)



Результаты определения фторхинолонов в куриных яйцах. При выбранных условиях подготовки проб и хроматографического разделения полученных экстрактов было проанализировано 34 пробы куриных яиц. В 7 пробах были обнаружены определяемые компоненты на уровне от 15 до 60 мкг/кг. В 3 пробах яиц содержание энрофлоксацина составляло 110, 170 и 330 мкг/кг соответственно, что превышает предписанный нормативной документацией уровень 100 мкг/кг. Во всех исследованных положительных пробах обнаружен энрофлоксацин, в 4 из 10 проб ципрофлоксацин и в 1 пробе дифлоксацин. На рис. 5 представлены примеры полученных хроматограмм экстрактов куриных яиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, была разработана методика одновременного определения антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием. В результате проведенных исследований получены основные валидационные характеристики методики, рассчитана относительная расширенная неопределенность аналитических измерений. По своим валидационным характеристикам методика может быть использована для определения остаточных количеств антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах. По диапазону определяемых содержаний методика позволяет определять следовые количества антибиотиков на уровне допустимых значений 100 мкг/кг в соответствии с Сан-Пин 2.3.2.2804-10 и «Едиными санитарно-эпидемиологическими и гигиеническими требованиями к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ Р 51600-2010. Молоко и молочные продукты. Микробиологические методы определения наличия антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2010. — 19 с.
2. ГОСТ Р 53601-2009. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. — М.: Стандартинформ, 2010. — 12 с.
3. ГОСТ Р 53774-2010. Молоко и молочные продукты. Иммуноферментные методы определения наличия антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2010. — 12 с.
4. ГОСТ Р 53912-2010. Продукты пищевые. Экспресс-метод определения антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2011. — 6 с.
5. ГОСТ Р 54655-2011. Мед натуральный. Метод определения антибиотиков. — М.: Стандартинформ, 2012. — 14 с.
6. 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.: Стандартинформ, 2013. — 16 с.
7. МУК 1538-5/23. Методические указания по арбитражному определению остаточного содержания хинолонов в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-

спектрометрическим детектором / ФГУ «ВГНКИ». — М., 2011. — 26 с.
8. МУК 4.2.026-95. Экспресс-метод определения антибиотиков в пищевых продуктах. Методические указания.
9. МУК 759/5.3. Методические указания по арбитражному определению аминогликозидов в продукции животноводства методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором / ФГУ «ВГНКИ». — М., 2013. — 25 с.
10. Application of single drop liquid-liquid-liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis / W. Gao, G. Chen, Y. Chen [et al.] // J. Chromatogr. B. — 2011. — Vol. 879. — P. 291–295.
11. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis / M. Hernandez, C. Aguilar, F. Borrull, M. Calull // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 772. — P. 163–172.
12. Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle q using solid-phase extraction and capillary electrophoresis / D. Barron, E. Jimenez-Lozano, S. Bailac, J. Barbosa // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 767. — P. 313–319.
13. Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk / X. Zhou, D. Xing, D. Zhu [et al.] // Talanta. — 2008. — Vol. 75. — P. 1300–1306.
14. Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sarafloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study / N. Srinivas, L. Narasu, B.P. Shankar, R. Mullangi // Biomed. Chromatogr. — 2008. — Vol. 22. — P. 1288–1295.
15. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of fluoroquinolone antibiotics in waters / A.V. Herrera-Herrera, J. Hernandez-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodriguez-Delgado // Electrophoresis. — 2010. — Vol. 31. — P. 3457–3465.
16. Hernandez M., Borrull F., Calull M. Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction // J. Chromatogr. B. — 2000. — Vol. 742. — P. 255–265.
17. HPLC determination of enoxacin, ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric (PIF) detection and multiemission scanning. Application to urine and serum / A. Espinosa-Mansilla, A.M. de la Pena, D. Gonzalez Gomez, F. Salinas // J. Chromatogr. B. — 2005. — Vol. 822. — P. 185–193.
18. Samanidou V.F., Christodoulou E.A., Papadoyannis I.N. Direct determination of five fluoroquinolones in chicken whole blood and in veterinary drugs by HPLC // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 325–331.
19. Samanidou V.F., Demetriou C.E., Papadoyannis I.N. Direct determination of four fluoroquinolones, enoxacin, norfloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC // Anal. Bioanal. Chem. — 2003. — Vol. 375. — P. 623–629.
20. Solid-phase extraction and HPLC determination of fluoroquinolones in surface waters / M. Sturini, A. Speltini, L. Pretali [et al.] // J. Sep. Sci. — 2009. — Vol. 32. — P. 3020–3028.

Таблица 2
Валидационные характеристики методики определения антибиотиков фторхинолонового ряда в куриных яйцах

Наименование антибиотика	Характеристики методики	Добавленное количество антибиотиков, мкг/кг			
		10	25	50	100
Марбофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	10,45	26,64	51,83	100,86
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	4,01	2,70	5,01	8,21
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	80,1	21,6	20,1	16,4
	Число измерений	16	16	16	16
Офлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,59	25,08	51,35	98,77
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,30	2,03	4,05	7,15
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	46,0	16,2	16,2	14,3
	Число измерений	16	16	16	16
Пефлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,38	24,64	50,56	98,45
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,38	2,70	5,31	9,78
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	47,6	21,6	21,2	19,6
	Число измерений	16	16	16	16
Норфлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	10,39	24,72	51,33	97,88
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,48	2,95	5,68	9,88
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	49,6	23,6	22,7	19,8
	Число измерений	16	16	16	15
Ципрофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,25	24,62	50,11	98,40
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	3,93	4,66	5,21	11,74
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	78,6	37,3	20,8	23,5
	Число измерений	16	16	16	15
Энрофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,28	24,74	50,62	98,60
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,00	3,74	3,73	13,35
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	40,0	30,0	14,9	26,7
	Число измерений 5 месяцев	16	16	16	16
Данофлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,54	24,84	50,62	98,38
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	1,93	2,12	3,53	8,03
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	38,6	17,0	14,1	16,1
	Число измерений	16	16	16	16
Сарафлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,81	24,23	51,17	99,44
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	2,14	2,20	4,44	6,3
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	42,8	16,2	17,8	12,6
	Число измерений	16	16	16	16
Дифлоксацин	Среднее измеренное содержание, мкг/кг	9,99	24,69	50,55	100,0
	Суммарная стандартная неопределенность измерения, мкг/кг	1,04	1,35	4,41	8,93
	Относительная расширенная неопределенность измерения, % (k=2)	20,8	10,8	17,6	17,9
	Число измерений	16	16	16	16

21. Solid-phase microextraction with micellar desorption and HPLC-fluorescence detection for the analysis of fluoroquinolones residues in water samples / S.M. Esponda, M.E.T. Padron, Z.S. Ferrera, J.J.S. Rodriguez // Anal. Bioanal. Chem. — 2009. — Vol. 394. — P. 927–935.
22. Sowinski K.M., Kays M.B. Determination of ciprofloxacin concentrations in human serum and urine by

HPLC with ultraviolet and fluorescence detection // J. Clin. Pharm. Ther. — 2004. — Vol. 29. — P. 381–387.
23. Turiel E., Bordin G., Rodriguez A.R. Determination of quinolones and fluoroquinolones in hospital sewage water by off-line and on-line solid-phase extraction procedures coupled to HPLC-UV // J. Sep. Sci. — 2005. — Vol. 28. — P. 257–267.