



Стрелецкий А.В., Савостикова О.Н.

Хромато-масс-спектрометрическое определение антибиотиков тетрациклинового ряда в воде с использованием одноквадрупольного масс-анализатора

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управление медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Антибиотики наряду с другими фармацевтическими препаратами встречаются в поверхностных, подземных водах и питьевой воде в малых концентрациях, что является определённым фактором риска возникновения негативного влияния как на экосистему, так и на здоровье человека. Стандартные методы очистки сточных вод зачастую неэффективны для удаления малых органических молекул, в том числе антибиотиков тетрациклинового ряда. Для решения этой задачи необходимы мониторинг и постоянный контроль на основе анализа сточных вод. Современные аналитические методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС), позволяют определять следовые концентрации веществ. В данной работе представлен новый способ качественного и количественного анализа с использованием квадрупольного масс-анализатора как возможная альтернатива тандемной масс-спектрометрии.

Материалы и методы. Антибиотики тетрациклинового ряда (окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин) в водных средах определяли в режиме сканирования выбранных ионов методом ВЭЖХ-МС и в режиме регистрации выбранных реакций методом тандемной масс-спектрометрии ВЭЖХ-МС/МС.

Результаты. Установлены хроматографические и масс-спектрометрические критерии идентификации тетрациклинов, определяющие такие ключевые параметры работы квадрупольного масс-анализатора, как сканирование выделенного иона по его массе к заряду (m/z), время и продолжительность регистрации сигнала. Разработанный способ анализа тетрациклинов с использованием квадрупольного масс-анализатора демонстрирует аналитические характеристики, сопоставимые с тандемной масс-спектрометрией на базе тройного квадрупольного масс-анализатора. Выполнена апробация разработанного способа анализа на квадрупольном масс-анализаторе при исследовании водных проб природных объектов (питьевая вода, вода централизованного водоснабжения и очищенные сточные воды). В представленном способе анализа водных проб был упрощён подход пробоподготовки, что позволило оценить содержание антибиотиков от 1 нг/мл и выше в зависимости от типа водной матрицы (дистиллированная вода, вода централизованного водоснабжения, очищенные сточные воды) без трудоёмкой твердофазной экстракции и концентрирования проб.

Ограничения исследования. В настоящей работе определяли только исходные формы тетрациклинов без выявления продуктов их химической трансформации и эпимеризации. Представленный подход возможно применять для анализа сточных вод и проверки качества их очистки при концентрации микрозагрязнителей (в данном случае — антибиотиков тетрациклинового ряда) выше 10 нг/мл.

Заключение. В разработанном нами способе анализа одноквадрупольный масс-анализатор может служить альтернативой более дорогому по начальной стоимости и обслуживанию тандемному масс-спектрометру. Такие ключевые параметры анализа, имеющие принципиальное значение при экологическом мониторинге, как селективность и чувствительность, улучшаются при настройке режима сканирования выделенных ионов. Последнее было успешно продемонстрировано на примере анализа тетрациклинов в водной среде, и данный подход может стать основой для разработки методик определения на базе квадрупольного масс-спектрометра фармацевтических препаратов в водных пробах окружающей среды.

Ключевые слова: водные пробы; тетрациклины; масс-спектрометрия; электрораспылительная ионизация; жидкостная хроматография

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Для цитирования: Стрелецкий А.В., Савостикова О.Н. Хромато-масс-спектрометрическое определение антибиотиков тетрациклинового ряда в воде с использованием одноквадрупольного масс-анализатора. *Гигиена и санитария*. 2025; 104(1): 110–116. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2025-104-1-110-116> <https://elibrary.ru/sbmjbj>

Для корреспонденции: Стрелецкий Алексей Владимирович, e-mail: AStreletsky@cspfmba.ru

Участие авторов: Стрелецкий А.В. — сбор и обработка материала, выполнение экспериментальной работы, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Савостикова О.Н. — концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках темы госзадания: рег. № 388-00099-23-02, № 123040500002-3.

Поступила: 18.10.2023 / Поступила после доработки: 24.07.2024 / Принята к печати: 02.10.2024

Alexey V. Streletskiy, Olga N. Savostikova

Chromatographic mass spectrometric determination of tetracycline antibiotics in water using a single-quadrupole mass analyzer

Center for Strategic Planning of the FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Antibiotics and other pharmaceuticals are increasingly detected in surface groundwater, and drinking water, raising concerns about their potential adverse impacts on ecosystems and human health. Standard wastewater treatment methods often fail to effectively remove these compounds, particularly small organic molecules like tetracycline antibiotics, leading to their persistence in the environment. To address this issue, continuous monitoring and surveillance are necessary, including regular analysis of wastewater. Modern analytical methods, such as high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection (HPLC-MS), allow detecting trace concentrations. This work presents a new method for qualitative and quantitative analysis using a quadrupole mass analyzer, which can serve as an alternative to tandem mass spectrometry.

Materials and methods. Tetracycline antibiotics (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, and doxycycline) in aquatic environments were detected using selected ion monitoring (HPLC-MS) and selected reaction monitoring through tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

Results. There have been established chromatographic and mass spectrometric criteria for the identification of tetracyclines, determining key operating parameters for the quadrupole, such as selected ion scanning based on mass-to-charge ratio (m/z), signal registration time, and duration. The developed method for analyzing tetracyclines using a quadrupole mass analyzer demonstrates analytical characteristics comparable to tandem mass spectrometry based on a triple quadrupole mass analyzer. The method was validated on a quadrupole mass analyzer during the analysis of water samples from natural sources (drinking water, centralized water supply, and treated wastewater). In this analytical approach, the sample preparation process was simplified, allowing for the assessment of antibiotic content in samples without the need for labour-intensive solid-phase extraction and concentration, starting from 1 ng/ml and above (for various types of water matrices).

Limitations. In this study, only the intact forms of tetracyclines were identified. Separate investigations into the detection of their chemical transformation products and epimerization were not conducted. The presented approach can be applied for analyzing wastewater and assessing the quality of its treatment, where the concentration of tetracycline antibiotics as micro-pollutants may exceed 10 ng/mL.

Conclusion. The proposed analytical method using a single quadrupole mass analyzer can serve as an alternative to the more expensive tandem mass spectrometer, both in terms of acquisition cost and maintenance. Key analytical characteristics that are important for environmental monitoring, such as selectivity and sensitivity, can be enhanced by optimizing the selected ion scanning mode. This was successfully demonstrated in the analysis of tetracyclines in aquatic environments. This approach could serve as a foundation for developing methodologies for detecting pharmaceutical compounds in environmental water samples using a quadrupole mass spectrometer.

Keywords: water probe; tetracyclines; mass-spectrometry; electrospray ionization; liquid chromatography

Compliance with ethical standards. This study does not require the conclusion of a biomedical ethics committee or other documents.

For citation: Streletskiy A.V., Savostikova O.N. Chromatographic mass-spectrometric determination of tetracycline antibiotics in water using a quadrupole mass analyzer. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2025; 104(1): 110–116. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2025-104-1-110-116> <https://elibrary.ru/sbmjbj> (In Russ.)

For correspondence: Aleksey V. Streletskiy, e-mail: AStreletsky@cspfmba.ru

Contribution: Streletskiy A.V. — the concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing a text; Savostikova O.N. — the concept and design of the study, text writing, editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was completed within the framework of the state task: reg. No 388-00099-23-02, No 123040500002-3.

Received: October 18, 2023 / Revised: July 24, 2024 / Accepted: October 2, 2024

Введение

Антибиотики наряду с другими фармацевтическими препаратами встречаются в поверхностных и подземных водах в диапазоне концентраций от нг/мл до мкг/мл. Основным источником загрязнения окружающей среды лекарственными средствами (ЛС) — выделения принимавших их пациентов [1]. До 90% применяемого лекарственного средства может выводиться из организма без изменений [2]. Из сточных вод при традиционных процессах очистки ЛС зачастую удаляются не полностью или преобразуются [3, 4]. Неправильная утилизация промышленных, больничных отходов и ЛС, а также стоки с ферм и свалок способствуют появлению в природных водах входящих в состав фармацевтических препаратов веществ и приводят к широкому распространению их в водной среде [5, 6]. В частности, более высокие концентрации в сточных водах могут быть обнаружены, когда на станцию очистки сточных вод поступает значительный объем стоков фармацевтического производства [7, 8]. Некоторые фармацевтические препараты разлагаются частично или очень медленно, в то время как другие менее устойчивы, но непрерывно поступают в окружающую среду [9]. Кроме того, постоянное высвобождение фармацевтических препаратов часто превышает скорость разложения и превращает их в псевдопостоянные загрязнители [10, 11].

Вышесказанное определяет актуальность поиска доступного и надежного метода мониторинга водных сред для определения в них фармацевтических препаратов. Поскольку требуется проводить анализ сложных многокомпонентных систем, необходимо использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). При выборе метода детектирования аналитов основное внимание уделяется селективности, чувствительности и линейности аналитического сигнала, а также возможности одновременного анализа большого количества соединений одной или нескольких групп.

В нашей работе объектом исследования были выбраны коммерчески доступные и наиболее распространенные антибиотики тетрациклинового ряда (тетрациклин, доксициклин, окситетрациклин и хлортетрациклин). Благодаря антибактериальному эффекту и редким побочным реакциям тетрациклиновые антибиотики нашли широкое применение при лечении различных бактериальных инфекций, активно добавляются в корма животным как стимуляторы роста крупнорогатого скота, свиней, птиц [12]. В мировом

масштабе тетрациклины наиболее часто используют в животноводстве в качестве противомикробных препаратов. По оценкам [13], объем мирового потребления тетрациклинов в 2020 г. составил 33 305 т — 33% от общего количества всех антибиотиков, применяемых в животноводстве. Прогнозируется, что к 2030 г., несмотря на вводимые ограничения, потребление тетрациклинов увеличится еще на 9%. Животноводческая отрасль потребляет до двух третей объема мирового производства антибиотиков.

Российский стандарт ГОСТ 31694–2012¹ устанавливает метод определения остаточного содержания антибиотиков в пищевых продуктах и продовольственном сырье. Американский стандарт ЕРА 1694² (Агентство по охране окружающей среды США) устанавливает метод определения широкой группы фармацевтических препаратов (в том числе антибиотиков тетрациклинового ряда и продуктов их трансформации) в воде, почве, осадках и биологических твердых веществах.

В современной научной литературе публикации, связанные с количественным определением тетрациклинов в различных матрицах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором, посвящены только тандемному способу. Такой подход налагает приборные ограничения применения метода в связи с необходимостью трех квадруполей. Например, стоимость системы ВЭЖХ-МС/МС на тройном квадрупольном масс-анализаторе (\$200 000–400 000) в два-три раза выше, чем системы ВЭЖХ-МС на одноквадрупольном масс-анализаторе (\$80 000–90 000)³. Поэтому, закладывая в структуру стоимости анализа проб амортизацию оборудования, мы получаем дорогой метод для постоянного мониторинга, который больше применяется не столько в рутинном анализе, сколько в научных исследованиях.

Цель работы заключается в разработке нового подхода к проведению хромато-масс-спектрометрического анализа тетрациклиновых антибиотиков в водных пробах окружающей среды с использованием квадрупольного масс-анализатора как более доступного аналога тандемной масс-спектрометрии.

¹ ГОСТ 31694–2012. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

² Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS.

³ Данные маркетплейса Alibaba.com

Материалы и методы

Объект исследования. В качестве стандартных образцов использовали антибиотики тетрациклинового ряда (производство Sigma-Aldrich, США): окситетрациклина гидрохлорид, тетрациклина гидрохлорид, доксициклина гидрат, хлортетрациклина гидрохлорид. Основные растворы антибиотиков с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением навесок в метаноле. Приготовленные растворы хранили при температуре не выше минус 20 °С.

Материалы и оборудование. Использовали деионизированную воду высокой степени очистки (Milli-Q® Integral 5, Merck Millipore, Франция). Органическим компонентом подвижной фазы для хроматографического разделения служил ацетонитрил для ВЭЖХ, сорт 1, ТУ 6–09–5497 (НПК «Криохром», Россия). В качестве добавки к водному компоненту подвижной фазы применяли муравьиную кислоту для ВЭЖХ-МС 98%-й чистоты (Sigma Aldrich, США).

Для подготовки проб применяли посуду мерную лабораторную стеклянную (ГОСТ 1770), автоматические механические дозаторы Ленпипет 100 и 1000 мм³, пластиковые пробирки объемом 1,5 и 15 см³. Для хроматографирования использовали систему ВЭЖХ Agilent серии 1200 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6430 (QQQ) и отдельными модулями (насосом, термостатом колонок и автоэмплером) (все – Agilent Technologies, США).

Условия хроматографического разделения. Для разделения компонентов применяли колонку для обращенно-фазовой хроматографии Zorbax SB-C18 (диаметр сорбента 1,8 мкм), 50 × 2,1 мм (Agilent Technologies, США) при температуре плюс 30 °С в изократическом режиме элюирования. В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей: 70% (об.) 0,1%-го водного раствора муравьиной кислоты и 30% (об.) ацетонитрила. Расход подвижной фазы – 0,2 мл/мин. Длительность хроматографирования – 5 мин. Объем инъекции – 5 мкл. Анализ образцов проводили в двух повторностях.

Условия масс-спектрометрического детектирования. Метод – электрораспылительная ионизация. Детектирование выполняли в режимах сканирования (или мониторинга) выделенных положительных ионов (в англоязычной литературе известен как Selected Ion Monitoring – SIM) и выбранных реакций (в англоязычной литературе известен как Multiple Reaction Monitoring – MRM). В источник ионизации подавался осушающий поток азотного газа со скоростью 12,5 л/мин и температурой плюс 350 °С. Напряжение на распыляющем капилляре было равно 4000 В. Регистрация ионов могла проводиться как в условиях работы только одного квадруполь в режиме сканирования выделенных ионов, так и в режиме тандемной масс-спектрометрии при последовательном сканировании выделенных ионов-предшественников и их фрагмент-ионов.

Регистрация в режиме SIM протонированных и катионированных молекул анализа проводилась при значении энергии фрагмента 135 В, диагностических ионов-фрагментов при более высоком значении энергии фрагмента в 170 В, что необходимо для улучшения выхода ионов-фрагментов. Регистрация в режиме MRM проводилась при фиксированном значении энергии соударения 20 В.

Регистрацию и обработку получаемых экспериментальных данных выполняли с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter (США). Анализ и построение графиков проводили с использованием скриптов на языке программирования R, предназначенном для статистической обработки данных и работы с графикой, в свободной среде разработки программного обеспечения RStudio (Posit Software, PBC).

Критерии идентификации целевых аналитов. Согласно требованиям к целевому определению аналитов, изложенным в общих руководствах Европейского союза⁴ и Все-

Таблица 1 / Table 1

Хроматографические критерии идентификации тетрациклинов Chromatographic criteria for tetracycline identification

Аналит Analyte	Время удерживания, мин Retention time, min	Период сканирования иона аналита, мин Scanning period analyte ion, min
Окситетрациклин / Oxytetracycline	3.0 ± 0.1	2.5–3.5
Тетрациклин / Tetracycline	3.2 ± 0.1	2.8–3.8
Хлортетрациклин / Chlortetracycline	4.5 ± 0.1	4.2–5.2
Доксициклин / Doxycycline	5.0 ± 0.1	4.6–5.6

мирного допингового агентства⁵, для достоверной идентификации необходимо использовать как минимум три разных иона в режиме сканирования при хромато-масс-спектрометрическом анализе. Устанавливаемые относительные времена удерживания хроматографических пиков диагностических ионов должны быть равны в пределах ± 0,1 мин. Отношение интенсивности диагностического иона к иону-предшественнику должно оставаться постоянным в следующих диапазонах: > 50% (± 20%), > 20% до 50% (± 25%), > 10% до 20% (± 30%), ≤ 10% (± 50%). С учётом всех установленных требований нами были приняты следующие хроматографические и масс-спектрометрические критерии идентификации тетрациклинов, представленные соответственно в табл. 1 и 2.

Пробоподготовка. Непосредственно перед анализом готовили рабочие растворы аналитов окситетрациклина, тетрациклина, хлортетрациклина и доксициклина последовательным десятикратным разбавлением основного раствора водой (дистиллированной, отфильтрованных водных проб), подкисленной муравьиной кислотой (рН = 3,0). Диапазон концентраций растворов аналитов составлял от 1 до 10 000 нг/мл. Внутренний стандарт не использовали.

Антибиотики тетрациклинового ряда определяли в пробах питьевой воды централизованного водоснабжения, воды централизованного водоснабжения, очищенных сточных вод. Пробы объемом 7 мл отбирали в конические полипропиленовые пробирки ёмкостью 10 мл, центрифугировали при 3500 rpm (центрифуга CM-6M, Elmi) в течение 15 мин и фильтровали (шприцевые фильтры с размером пор 0,45 мкм), затем 100 мкл отфильтрованного раствора аналита переносили в хроматографическую виалу ёмкостью 1,5 мл с добавлением 300 мкл водной подвижной фазы.

Результаты

Идентификация тетрациклинов по критериям. На рис. 1 представлены масс-хроматограммы ионов аналитов (концентрация 1000 нг/мл), по которым проводили идентификацию антибиотиков. Сканирование выделенных по m/z ионов выполняли только в области ранее установленного времени удерживания тетрациклинов с окном сканирования 1 мин (см. табл. 1). Определение аналита выполняли одновременно по нескольким специфическим критериям, приведённым в табл. 2: обнаружены молекулярный ион в виде протонированной молекулы $[M+H]^+$ (или) катионированной молекулы $[M+Na]^+$ вместе с ионами-фрагментами, формируемыми в ионном источнике. При этом во всех случаях время удерживания аналита на масс-хроматограммах должно оставаться неизменным в пределах ± 0,1 мин. Все регистрируемые хроматографические пики должны быть релевантными, то есть соответствовать отношению «сигнал / шум» > 3.

⁵ WADA Technical Document – TD2023IDCR – Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes, <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2023idcr>

⁴ EU Commission Directive 2002/657/EC, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32002D0657>

Таблица 2 / Table 2

Масс-спектрометрические критерии идентификации тетрациклинов
Mass spectrometry criteria for tetracycline identification

Аналит Analyte	Ион-предшественник, <i>m/z</i> (отн. интенсивность) Ion precursor <i>m/z</i> , relative intensity	Диагностический ион, <i>m/z</i> (интенсивность по отношению к иону-предшественнику) Diagnostic ion <i>m/z</i> (relative intensity to precursor ion)			
		[M+Na] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-NH ₃] ⁺	[M+H-H ₂ O-NH ₃] ⁺
Окситетрациклин Oxytetracycline	461 (100%)	483 (<5%)	Нерелевантное Non relevant	444 (12 ± 6%)	426 (9 ± 4.5%)
Тетрациклин Tetracycline	445 (100%)	467 (<5%)	427 (<5%)	Нерелевантное Non relevant	410 (5 ± 1.5%)
Хлортетрациклин Chlortetracycline	479 (100%)	501 (<5%)	462 (8 ± 4%)	Нерелевантное Non relevant	444 (66 ± 13.2%)
Доксициклин Doxycycline	445 (100%)	467(<5%)	Нерелевантное Non relevant	428 (6 ± 3%)	Нерелевантное Non relevant

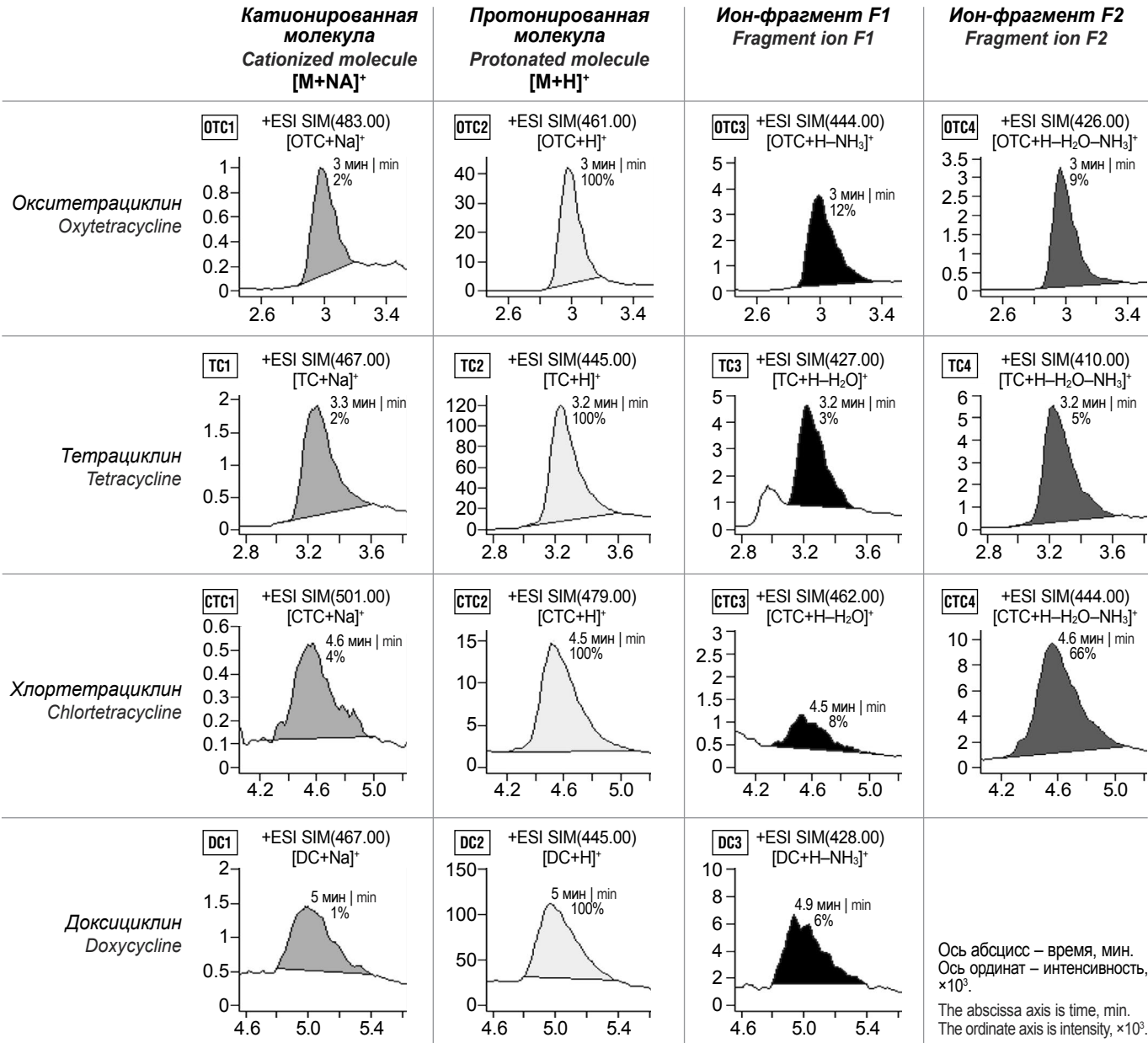


Рис. 1. Масс-хроматограммы выделенных ионов аналитов окситетрациклина (ОТС), тетрациклина (ТС), хлортетрациклина (СТС) и доксициклина (ДС) в дистиллированной воде: катионированная молекула [M+Na]⁺ (ОТС1, ТС1, СТС1, ДС1), протонированная молекула [M+H]⁺ (ОТС2, ТС2, СТС2, ДС2) и ионы-фрагменты F1, F2 (ОТС3, ОТС4, ТС3, ТС4, СТС3, СТС4, ДС3, ДС4).

Fig. 1. Mass chromatograms of extracted ions of analytes: oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), and doxycycline (DC) in distilled water: cationized molecule [M+Na]⁺ (OTC1, TC1, CTC1, DC1), protonated molecule [M+H]⁺ (OTC2, TC2, CTC2, DC2), and fragment ions F1, F2 (OTC3, OTC4, TC3, TC4, CTC3, CTC4, DC3, DC4).

Таблица 3 / Table 3

Аналитические характеристики разработанного способа анализа тетрациклиновых антибиотиков с использованием квадрупольного масс-анализатора

Analytical characteristics of the developed method for analyzing tetracycline antibiotics based on a mass spectrometer with a quadrupole mass analyzer

Аналит Analyte	Матрица – дистиллированная вода Matrix – distilled water			Матрица – питьевая вода Matrix – drinking water			Матрица – водопроводная вода Matrix – tap water			Матрица – очищенная сточная вода Matrix – Treated wastewater		
	ПО*, нг/мл ng/mL	ПКО**, нг/мл ng/mL	R^2	ПО, нг/мл ng/mL	ПКО, нг/мл ng/mL	R^2	ПО, нг/мл ng/mL	ПКО, нг/мл ng/mL	R^2	ПО, нг/мл ng/mL	ПКО, нг/мл ng/mL	R^2
Окситетрациклин Oxytetracycline	1.4	4.3	0.9999	2.5	7.7	0.9950	3.2	9.73	0.9990	6.0	18.2	0.9987
Тетрациклин Tetracycline	0.9	2.7	0.9994	2.1	6.3	0.9978	3.4	10.3	0.9993	5.2	15.6	0.9997
Хлортетрациклин Chlortetracycline	3.1	9.2	0.9992	13.9	42.3	0.9950	18.8	56.9	0.9967	26.2	79.3	0.7574
Доксициклин Doxycycline	1.0	3.0	0.9995	3.9	9.0	0.9914	13.41	40.6	0.9755	1.9	5.8	0.9933

Примечание. Здесь и в табл. 4: * ПО – предел обнаружения; ** ПКО – предел количественного определения.

Note: Here and in tabl. 4: * PO – Detection limit, ** PKO – Quantification limit.

Для трёх аналитов (окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин) установлены четыре иона, по которым могут быть идентифицированы соединения соответственно: катионированная ($[M+Na]^+$), протонированная ($[M+H]^+$) молекулы и два специфичных иона-фрагмента. В то же время для доксициклина установлено только три релевантных иона, включающих $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$ и ион-фрагмент. Количественное определение аналитов может проводиться по наиболее интенсивным ионам – $[M+H]^+$. Отдельно были определены отношения интенсивности иона-фрагмента к иону-предшественнику для установления дополнительного критерия достоверности идентификации соединения. Отдельно отметим, что в целом интенсивность образуемых ионов-фрагментов остаётся низкой в данных условиях ионизации, что может быть причиной затруднения идентификации соединений при очень малых концентрациях.

Аналитические характеристики. Нами определены аналитические характеристики разработанного способа анализа тетрациклиновых антибиотиков с использованием одноквадрупольного масс-анализатора (табл. 3). Для этого были построены графики зависимости концентрации от площади хроматографического пика интенсивности иона-предшественника в диапазоне концентраций 1–10 000 нг/мл. Во всех случаях аналитическая область (10–1000 нг/мл) определялась линейной регрессией с коэффициентом корреляции $R^2 > 0,99$. Пределы обнаружения (ПО) и количественного определения (ПКО) были оценены по стан-

дартному отклонению аналитического сигнала в холостом образце в шести повторях (SD) и наклону линейной регрессии (а): $ПО = 3,3 \cdot SD/a$, $ПКО = 10 \cdot SD/a$.

Для сравнения предлагаемого способа анализа на одноквадрупольном масс-анализаторе с тандемной масс-спектрометрией (тройной квадруполь) проводили детектирование пиков методом регистрации выбранных реакций, условия которого указаны в стандарте на метод идентификации и количественного определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в продуктах питания с использованием ВЭЖХ-МС/МС⁶. В результате анализа полученных данных были определены следующие аналитические характеристики (табл. 4).

Анализ проб окружающей среды. Была проведена апробация предложенного способа анализа на одноквадрупольном масс-анализаторе. Рассматривались различные пробы питьевой воды, водопроводной воды и очищенных сточных вод. При анализе применяли следующий подход. Первоначально выполняли прямой анализ проб с минимальной пробоподготовкой (центрифугирование, фильтрование и разбавление подкислённой чистой водой). Отсутствие в пробе положительных сигналов наличия антибиотиков, отвечающих хроматографическим и масс-спектрометрическим критериям (см. табл. 1, 2), свидетельствовало об отсутствии концентраций антибиотиков ниже предела обнаружения. Для оценки последнего выполняли анализ градуировочных растворов в матрице в диапазоне от 10^0 до 10^3 нг/мл. По градуировочным характеристикам определяли такие метрологические характеристики, как пределы обнаружения и количественного определения концентрации в матричном растворе (см. табл. 2).

При обнаружении в пробах по масс-хроматограммам сигналов иона-предшественника и двух его ионов-фрагментов в установленном диапазоне времени сканирования делали вывод о возможном наличии в пробе аналита (рис. 2). В нашем случае таким критериям отвечали только два соединения: окситетрациклин и тетрациклин. В пределах времени удерживания соответствующего соединения (3 мин – тетрациклин, 3,2 мин – окситетрациклин) наблюдаются ионы как протонированной молекулы $[M+H]^+$ (m/z 461 для окситетрациклина и m/z 445 для тетрациклина), так и фрагментов-ионов (m/z 444 и m/z 426 для окситетрациклина) и (m/z 427 и m/z 410 для тетрациклина). Данные об остальных целевых аналитах не соответствовали установленным

⁶ ГОСТ 31694–2012. Продукты пищевые, продовольственное сырьё. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

Таблица 4 / Table 4

Аналитические характеристики определения тетрациклиновых антибиотиков с использованием тандемной масс-спектрометрии на базе тройного квадрупольного масс-анализатора

Analytical characteristics of tetracycline antibiotics detection by tandem mass spectrometry based on triple quadrupole mass analyzer

Аналит Analyte	ПО, нг/мл ng/mL	ПКО, нг/мл ng/mL	R^2
Окситетрациклин Oxytetracycline	0.5	1.5	0.9907
Тетрациклин Tetracycline	0.6	1.9	0.9969
Хлортетрациклин Chlortetracycline	1.6	4.9	0.9957
Доксициклин Doxycycline	0.7	2.0	0.9843

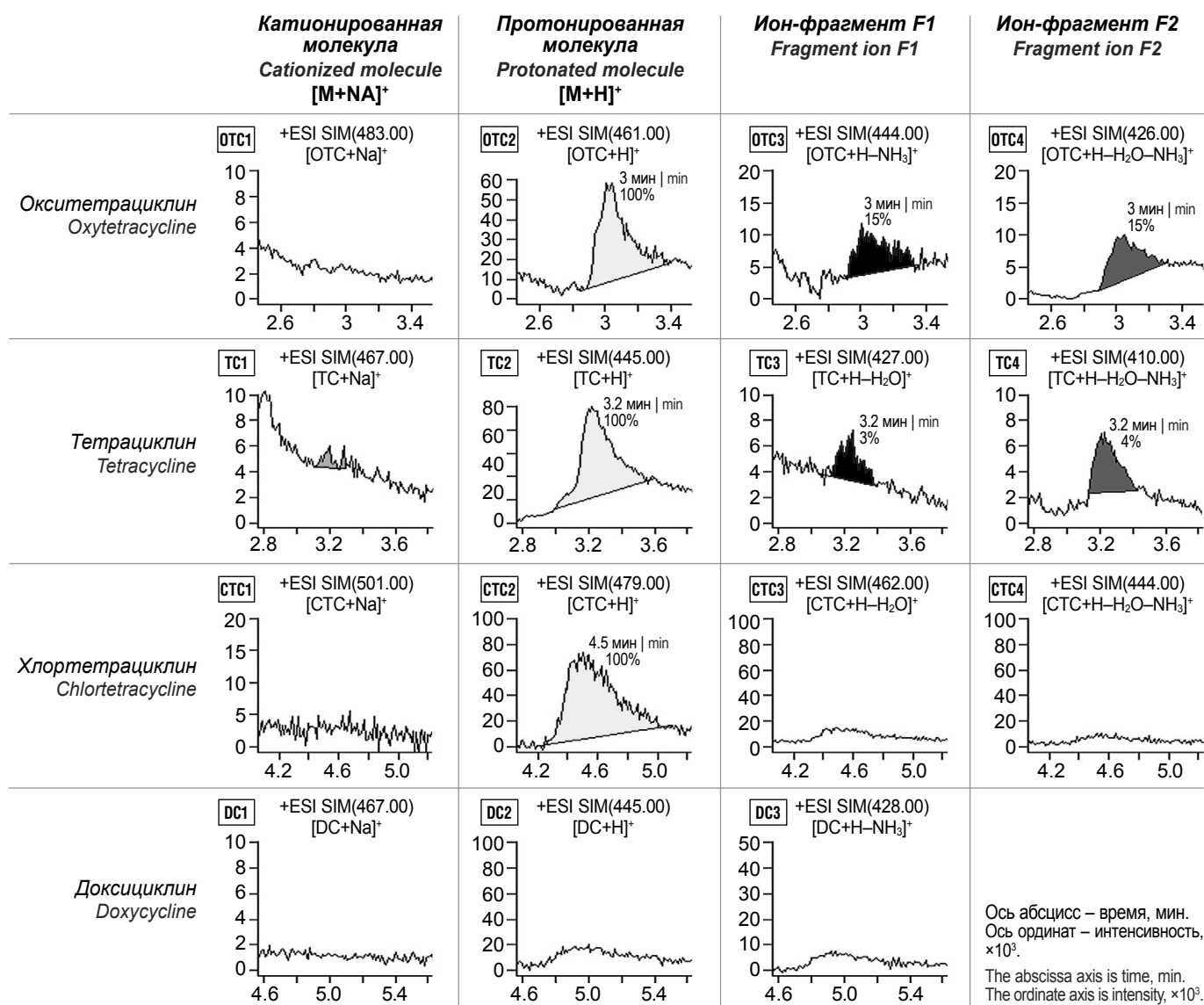


Рис. 2. Масс-хроматограммы выделенных ионов аналитов окситетрациклина (ОТС), тетрациклина (ТС), хлортетрациклина (СТС) и доксициклина (ДС) в водной пробе очищенных сточных вод: катионированная молекула [M+Na]⁺ (ОТС1, ТС1, СТС1, ДС1), протонированная молекула [M+H]⁺ (ОТС2, ТС2, СТС2, ДС2) и ионы-фрагменты F1, F2 (ОТС3, ОТС4, ТС3, ТС4, ДС3).

Fig. 2. Mass chromatograms of extracted ions of analytes: oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), and doxycycline (DC) in a water sample of treated wastewater: cationized molecule [M+Na]⁺ (OTC1, TC1, CTC1, DC1), protonated molecule [M+H]⁺ (OTC2, TC2, CTC2, DC2), and fragment ions F1, F2 (OTC3, OTC4, TC3, TC4, DC3).

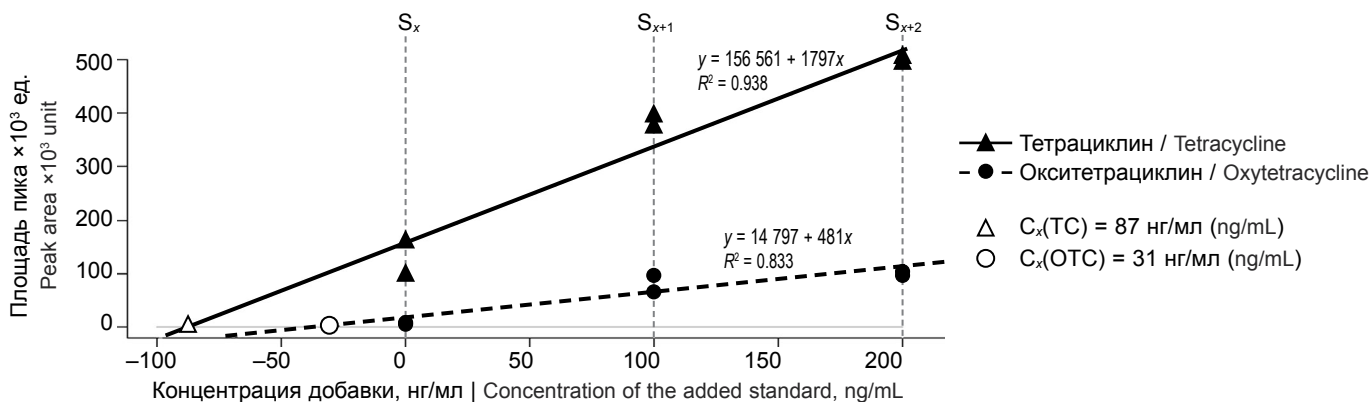


Рис. 3. Определение содержания целевых аналитов (тетрациклина и окситетрациклина) методом последовательных стандартных добавок с экстраполяцией на нулевую величину.

Fig. 3. Detection of the target analyte concentrations (tetracycline and oxytetracycline) by successive standard addition method with extrapolation to zero value.

критериям. Как правило, сигнал выделенных ионов находился на уровне шума. Исключением был хлортетрациклин, в масс-хроматограммах которого наблюдался пик протонированной молекулы $[M+H]^+$ при m/z 479, однако присутствия сигналов ионов-фрагментов мы не обнаружили.

Оценка содержания целевых аналитов (окситетрациклина и тетрациклина) проводилась в соответствии с методом последовательных стандартных добавок. Для двух веществ использовали концентрации добавок 100 и 1000 нг/мл. Незвестная концентрация (C_x) была установлена экстраполяцией на нулевую величину добавки (рис. 3), которая для окситетрациклина составляла $C_x(ОТС) = 31$ нг/мл, а для тетрациклина – $C_x(ТС) = 87$ нг/мл.

Обсуждение

Исторически основными детекторами ВЭЖХ являются рефрактометрический, ультрафиолетовый и флуоресцентный. Рефрактометрический детектор не применяют для градиентного хроматографического разделения компонентов. Флуоресцентный ограничен рядом специфических соединений, обладающих люминесценцией. ВЭЖХ с УФ-детектором не обладает достаточной специфичностью и высокой чувствительностью, необходимыми для экологического мониторинга. «Золотым стандартом» количественного определения органических низкомолекулярных соединений в диапазоне малых концентраций от нг/л до мкг/л считают tandemную масс-спектрометрию в режиме регистрации (мониторинга) выбранных реакций [14–16]. Для количественного определения антибиотиков тетрациклинового ряда применяются стандартизованные методики, основанные на использовании высокоскоростной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Однако масс-

спектрометры, позволяющие проводить tandemный анализ (тройной квадрупольный (QqQ), квадрупольный времяпролётный (Q-ToF)), являются дорогостоящим оборудованием как по начальной стоимости, так и по затратам на эксплуатацию по сравнению с простой моделью масс-спектрометра на базе квадрупольного масс-анализатора. Мы показали, что предлагаемый способ анализа с использованием квадрупольного масс-анализатора сопоставим по аналитическим характеристикам с методом tandemной масс-спектрометрии, основанной на тройном квадрупольном масс-анализаторе (см. табл. 3, 4). Селективность и чувствительность первого может быть улучшена при настройке режима сканирования выделенных ионов: ионов-предшественников и образуемых ионов-фрагментов (см. табл. 2).

В представленном способе анализа водных проб был упрощён этап пробоподготовки. Это позволяет оценить содержание антибиотиков в пробе, не прибегая к трудоёмкой твердофазной экстракции и концентрированию, в диапазоне ≈ 10 нг/мл и выше. Тем не менее очевидно, что для мониторинга соединений в диапазоне концентраций от 1 нг/л потребуются дополнительная очистка и концентрирование в 1000 раз.

Заключение

Анализ водных проб показал, что очистка сточных вод бывает недостаточной для удаления малых органических молекул, в том числе антибиотиков тетрациклинового ряда. Такая проблема существует для большинства очистных соединений и требует контроля и мониторинга. В разработанном нами способе анализа одноквадрупольный масс-анализатор может служить альтернативой более дорогому по начальной стоимости и обслуживанию tandemному масс-спектрометру.

Литература

(п.п. 1–11, 13–16 см. References)

12. Мирошникова М.С., Мирошникова Е.П., Аринжанов А.Е., Киякова Ю.В. Применение антибиотиков в сельском хозяйстве и альтер-

нативы их использования. *Аграрный научный журнал*. 2021; (5): 65–70. <https://doi.org/10.28983/asj.y2021i5pp65-70> <https://elibrary.ru/dyrlpb>

References

1. Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet*. 2000; 355(9217): 1789–90. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02270-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02270-4)
2. Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total. Environ.* 1999; 225(1–2): 109–18. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4)
3. Ekpeghere K.I., Sim W.J., Lee H.J., Oh J.E. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Sci. Total. Environ.* 2018; 640–641: 1015–23. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>
4. Evgenidou E.N., Konstantinou I.K., Lambropoulou D.A. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review. *Sci. Total. Environ.* 2015; 505: 905–26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.021>
5. Styszko K., Durak J., Kończak B., Głodniok M., Borgulat A. The impact of sewage sludge processing on the safety of its use. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 12227. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16354-5>
6. Pinto I., Simões M., Gomes I.B. An overview of the impact of pharmaceuticals on aquatic microbial communities. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 11(12): 1700. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121700>
7. Richmond E.K., Grace M., Kelly J.J., Reisinger A.J., Rosi E.J., Walters D.A. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are ecological disrupting compounds (EcoDC). *Elem. Sci. Anth.* 2017; 5(4): 66. <https://doi.org/10.1525/elementa.252>
8. Kumirska J. Special issue «Pharmaceutical residues in the environment». *Molecules*. 2020; 25(12): 2941. <https://doi.org/10.3390/molecules25122941>
9. Hanamoto S., Nakada N., Jürgens M.D., Johnson A.C., Yamashita N., Tanaka H. The different fate of antibiotics in the Thames River, UK, and the Katsura River, Japan. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018; 25(2): 1903–13. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0523-z>
10. Gonçalves T.M., Bedor D.C., de Abreu L.R., de Sousa C.E., Rolim C.M., de Santana D.P. Determination of ampicillin in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) and its use in bioequivalence studies. *Arzneimittelforschung*. 2008; 58(2): 91–6. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296474>
11. Kostopoulou M., Nikolaou A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends Analyt. Chem.* 2008; 27(11): 1023–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.011>
12. Miroshnikova M.S., Miroshnikova E.P., Arinzhonov A.E., Kiyakova Yu.V. Application of antibiotics in agriculture and alternatives of their use. *Agraranyi nauchnyi zhurnal*. 2021; (5): 65–70. <https://doi.org/10.28983/asj.y2021i5pp65-70> <https://elibrary.ru/dyrlpb> (in Russian)
13. Mulchandani R., Wang Y., Gilbert M., Van Boeckel T.P. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. *PLoS Glob. Public Health*. 2023; 3(2): e0001305. <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0001305>
14. Visconti G., Boccard J., Feinberg M., Rudaz S. From fundamentals in calibration to modern methodologies: A tutorial for small molecules quantification in liquid chromatography-mass spectrometry bioanalysis. *Anal. Chim. Acta*. 2023; 1240: 340711. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340711>
15. Picó Y., Blasco C., Font G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrom. Rev.* 2004; 23(1): 45–85. <https://doi.org/10.1002/mas.10071>
16. Gross M.L., Armentrout P.B., Caprioli R.M. *The Encyclopedia of Mass Spectrometry: Volume 1: Theory and Ion Chemistry*. Elsevier Science; 2003.

Сведения об авторах

Стрелецкий Алексей Владимирович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: AStreletsky@cspfmba.ru

Савостикова Ольга Николаевна, канд. мед. наук, начальник отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: OSavostikova@cspfmba.ru

Information about authors

Alexey V. Streletsky, PhD (Chemistry), Senior Researcher at the Department of Physico-Chemical Research and Ecotoxicology, Center for Strategic Planning of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-8194-1536> E-mail: AStreletsky@cspfmba.ru

Olga N. Savostikova, PhD (Medicine), Head of the Department of Physico-Chemical Research and Ecotoxicology, Center for Strategic Planning of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-7032-1366> E-mail: OSavostikova@cspfmba.ru