

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ и ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ в ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ методом масс-спектрометрии с МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ десорбцией/ионизацией

**Разработана новая экспрессная методика идентификации и определения остаточных количеств 30 антибиотиков методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией в питьевой воде. В качестве матрицы использовали наноповерхность стандартных подложек фирмы Bruker Daltonic («Nanosys MSP 96»). Для извлечения антибиотиков из воды использовали ацетонитрил. Пределы обнаружения составили 1–3 нг/л. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,09. Продолжительность анализа составляет 20–30 мин.**

## Введение

**Ш**ирокое использование антибиотиков в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности приводит к появлению и накоплению их в объектах окружающей среды. О возможности попадания антибиотиков в водные объекты сообщалось еще в 1999 г [1]. Возможные пути загрязнения поверхностных и питьевых вод, как отмечается в работах [2–4] — бытовые сточные воды, сточные воды животноводческих комплексов и рыбохозяйственных предприятий садкового разведения, сточные воды пищевой промышленности, а также технология подготовки тары для питьевой воды. В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют нормативные документы о содержании и определении антибиотиков в питьевой воде. Появились работы по определению антибио-

**Т.А. Краснова\***,  
аспирант, ФГБОУ  
ВПО Влади-  
мирский госу-  
дарственный  
университет име-  
ни Александра  
Григорьевича и  
Николая Григо-  
рьевича Столе-  
товых,

тиков в поверхностных и питьевых водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-детектором [2, 3, 5]. Однако данный метод сложен и требует длительной пробоподготовки (твердофазная экстракция).

В настоящее время одним из развивающихся методов исследования органических соединений является масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной диссоциацией/ионизацией (МС МАЛДИ) в сочетании с времяпролетным масс-анализатором. Суть метода заключается в облучении лазерными импульсами образца, представляющего собой твердый раствор исследуемого вещества в органической матрице. Матрица поглощает энергию УФ или ИК лазера и способствует десорбции анализа без разложения. Ионизация образца происходит в приповерхностном факеле путем ион-молекулярных реакций или процессов перезарядки. Образующиеся ионы выталкиваются коротким электрическим импульсом в бесполеовое пространство. При этом ионы с различным отношением массы к заряду ( $m/z$ ) приобретают различную скорость и достигают детектора в различное время, что обеспечивает регистрацию масс-спектра. Специальный детектор регистрирует время прибытия и интенсивность сигналов групп масс разрешенных ионов. В методе используются как органические, так и неорганические матрицы [6, 7].

Цель данной работы заключалась в разработке экспресс-методики идентификации и определения антибиотиков в питьевой воде методом МС МАЛДИ, демонстрации необходимости контроля содержания антибиотиков и введения нормативов по их содержанию в питьевой воде.

\*Адрес для корреспонденции: krasnova-ta@mail.ru

**Аппаратура.** В работе использовали масс-спектрометр МАЛДИ с времяпролетным масс-анализатором Autoflex III smartbeam («Bruker Daltonic», Германия). Использовали режим работы с рефлекторным для положительных и отрицательных ионов, основные параметры анализа: ультрафиолетовый азотный лазер с длиной волны 337 нм, длина импульса 3 нс, мощность лазерного излучения  $10^6$ – $10^7$  Вт/см<sup>2</sup>. Применяли автоматическое подавление сигналов массой до 300 Да. Анализ спектров проводили с использованием программы FlexAnalysis ver. 3.3 («Bruker Daltonic», Германия).

**Реактивы.** Использовали стандарты антибиотиков CRSO (Corporate Reference Standards Organization) «Eli Lilly and Company» (США): монензин, наразин, авиламицин; «Sigma-Aldrich» (Швейцария): тилмикозин, канамицин, неомицин, стрептомицин, дигидрострептомицин, ласалоцид, лаидломицин, эритромицин, салиномицин, джозамицин, спирамицин, рифабутин, семдурамицин, мадурамицин, тилозин, хлорте-

**В.Г. Амелин,** доктор химических наук, профессор кафедры химии, ФГБОУ ВПО Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых, ведущий научный сотрудник, Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

трациклин, окситетрациклин, доксициклин, тетрациклин, метациклин, демеклоциклин; «Dr. Ehrenstorfer» (Германия): спектиномицин, рифампицин, амикацин, полимиксин сульфат, валиномицин, бацитрацин.

Растворы антибиотиков 1 мг/мл готовили растворением соответствующих навесок в ацетонитриле «Prolabo» (Австрия). Рабочие растворы готовили в день использования разбавлением исходных ацетонитрилом.

**Пробоподготовка.** Отбирали 20 мл анализируемой воды, приливали 10 мл ацетонитрила, перемешивали и вносили 4 г хлорида натрия, перемешивали до расслоения фаз. Верхнюю ацетонитрильную фазу отбирали для анализа методом МС МАЛДИ. Раствор аналита (экстракта, антибиотика или смеси нескольких антибиотиков) смешивали с бидистиллированной водой в объемном соотношении 1:1 и 1 мкл смеси наносили на подложку «Nanosys MSP 96». Добавление воды необходимо для замедления кристаллизации пробы на поверхности подложки. По рекомендации производителя подложек кристаллизация пробы должна происходить в течение 10–15 мин, что обеспечивает связывание аналита, нанесенного на поверхность неорганической матрицы (углеродных нанонитей).

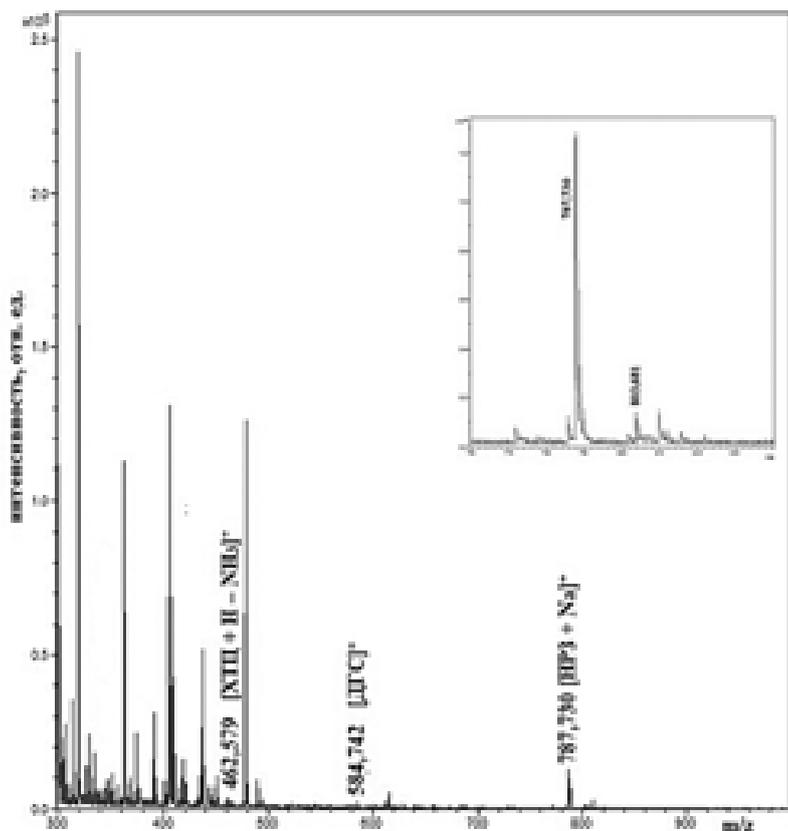


Рис. 1. Масс-спектр МАЛДИ экстракта из воды «Нарзан» (пластиковая тара).

## Результаты и их обсуждение

**М**асс-спектры антибиотиков при регистрации положительных ионов отличаются небольшим количеством хорошо разрешенных пиков, характерных для конкретных ионов соединения – в основном, это протонированные ионы  $[M + H]^+$  и аддукты с натрием или калием ( $[M + Na]^+$ ,  $[M + K]^+$ ) (табл. 1). При исследовании макролидов, тетрациклинов и некоторых полипептидов в масс-спектрах наблюдаются пики ионов, связанные с дефрагментацией молекул, особенно это характерно для полипептидов и тетрациклинов – отщепление молекул воды и аммиака –  $[M + Na - H_2O]^+$ ,  $[M + K - H_2O]^+$ ,  $[M + K - 3NH_3]^+$ ,  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$ ,  $[M - NH_3]^+$  (табл. 1, 2). Пределы обнаружения антибиотиков были определены по соотношению в их масс-спектрах сигнала и шума равному 4 и составили 1–3 нг/л.

В масс-спектрах ацетонитрильных экстрактов питьевой воды (бутилированной, водопроводной, колодезной) установлено наличие пиков некоторых антибиотиков.

**Таблица 1**

Характеристические массы для антибиотиков — аминогликозидов, макролидов и полипептидов (в скобках указаны молекулярные массы и класс антибиотика), полученные МС МАЛДИ при регистрации положительных ионов

№	Антибиотик (мол. масса) (класс)	Ион	m/z
1	Амикацин (585) (аминогликозид)	[AMK+H] <sup>+</sup>	586,483
2	Канамицин (484) (аминогликозид)	[KHM+H] <sup>+</sup>	485,478
3	Неомицин (614) (аминогликозид)	[HMC+H] <sup>+</sup>	615,465
4	Спектиномицин (332) (аминогликозид)	[СПМ+ H] <sup>+</sup> [СПМ+ Na] <sup>+</sup>	333,499 356,392
5	Стрептомицин (581) (аминогликозид)	[СТМ +H] <sup>+</sup>	582,751
6	Дигидрострептомицин (584) (аминогликозид)	[ДГС] <sup>+</sup>	584,635
7	Ласалоцид (588) (макролид)	[ЛСЦ + H] <sup>+</sup> [ЛСЦ + Na] <sup>+</sup>	589,643 611,634
8	Лаидломицин (669) (макролид)	[ЛДМ + Na] <sup>+</sup> [ЛДМ + K] <sup>+</sup>	692,678 708,657
9	Монезин (670) (макролид)	[MH3 + Na] <sup>+</sup> [MH3 + 2Na] <sup>+</sup> [MH3 + Na – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	693,636 715,640 675,510
10	Эритромицин (733) (макролид)	[ЭРМ+ H] <sup>+</sup> [ЭРМ+ Na] <sup>+</sup> [ЭРМ + K] <sup>+</sup>	734,786 756,853 771,900
11	Салиномицин (751) (макролид)	[СЛМ + H] <sup>+</sup> [СЛМ + Na] <sup>+</sup> [СЛМ + K] <sup>+</sup>	752,235 774,458 790,35
12	Наразин (764) (макролид)	[НРЗ+ Na] <sup>+</sup> [НРЗ+ K] <sup>+</sup>	787,775 803,760
13	Джозамицин (828) (макролид)	[ДЖМ + H] <sup>+</sup> [ДЖМ + K] <sup>+</sup> [ДЖМ + Na] <sup>+</sup>	828,767 866,620 850,644

№	Антибиотик (мол. масса) (класс)	Ион	m/z
14	Рифампицин (823) (макролид)	[РФП + H] <sup>+</sup> [РФП + Na] <sup>+</sup> [РФП + K] <sup>+</sup>	824,345 846,675 862,445
15	Спирамицин (843) (макролид)	[СПМ + H] <sup>+</sup>	843,862
16	Рифабутин (846) (макролид)	[РФБ + H] <sup>+</sup> [РФБ + Na] <sup>+</sup> [РФБ + K] <sup>+</sup>	847,560 870,564 885,625
17	Тилмикозин (868) (макролид)	[ТМК + H] <sup>+</sup>	869,794
18	Семдурамицин (873) (макролид)	[СДМ + H] <sup>+</sup> [СДМ + Na] <sup>+</sup> [СДМ + K] <sup>+</sup>	874,437 896,789 912,569
19	Мадурамицин (917) (макролид)	[МДМ + H] <sup>+</sup> [МДМ + Na] <sup>+</sup> [МДМ + K] <sup>+</sup>	918,349 940,568 956,543
20	Тилозин (915) (макролид)	[ТЛЗ + H] <sup>+</sup> [ТЛЗ + Na] <sup>+</sup>	916,829 938,864
21	Авиламицин (1404) (макролид)	[АВМ + K] <sup>+</sup> [АВМ + K + 2H] <sup>+</sup>	1444,022 1446,022
22	Валиномицин (1111) (полипептид)	[ВЛМ + H] <sup>+</sup> [ВЛМ + K] <sup>+</sup>	1112,125 1150,085
23	Полимиксин сульфат (1203) (полипептид)	[ПЛМ + H] <sup>+</sup> [ПЛМ + K - 3NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	1204,085 1190,063
24	Бацитрацин (1422) (полипептид)	[БЦЦ + H] <sup>+</sup> [БЦЦ + K - 3NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	1423,167 1409,115

**Таблица 2**

Характеристические массы для тетрациклинов, полученные методом МС МАЛДИ (в скобках указаны молекулярные массы), полученные при регистрации положительных ионов

№	Антибиотик	Ион	m/z
1	Хлортетрациклин (478)	[ХТЦ + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	462,279
2	Окситетрациклин (460)	[ОКЦ + Na - 2H] <sup>+</sup> [ОКЦ + H - NH <sub>3</sub> - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> [ОКЦ + H] <sup>+</sup>	481,303 426,291 461,263
3	Доксициклин (444)	[ДКЦ + H - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	428,257
4	Тетрациклин (444)	[ТТЦ + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> [ТТЦ + H - NH <sub>3</sub> - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	427,331 410,388
5	Метациклин (442)	[МТЦ - NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	426,425
6	Демеклоциклин (464)	[ДМЦ + H] <sup>+</sup>	465,445

Таблица 3

Идентификация антибиотиков в питьевой воде методом МС МАЛДИ

Проба	Характеристические массы (m/z), Да	Отношение сигнал / шум (S/N)	Высота пика в спектре, отн. ед.	Площадь пика в спектре, отн. ед.	Идентифицированный антибиотик
Вода «Нарзан» (пластиковая тара)	584,742	6,7	2204	209	Дигидрострептомицин
	787,730	84,4	12802	3211	Наразин
	803,681	9,4	1436	184	
	462,579	7,4	3359	349	Хлортетрациклин
Вода «Нарзан» (стеклянная тара)	410,341	39,7	17729	2035	Тетрациклин
	462,465	13,8	5818	499	Хлортетрациклин
Вода «Я» (пластиковая тара)	584,798	11,6	3203	362	Дигидрострептомицин
	333,523	114,2	95087	9289	Спектиномицин
	356,526	6,5	5964	477	
	584,726	5,3	1434	136	Дигидрострептомицин
	462,449	4,9	1931	142	Хлортетрациклин
Вода «Шишкин лес» (пластиковая тара)	787,749	52,3	5987	705	Наразин
	584,679	4,4	2024	181	Дигидрострептомицин
	787,625	10,8	2153	216	Наразин
	462,378	6,5	4182	322	Хлортетрациклин
	Вода «Суздальские напитки» (пластиковая тара)	Не обнаружено антибиотиков			
Вода «Липецкий бювет» (пластиковая тара)	584,708	14,4	2401	204	Дигидрострептомицин
	787,672	10,2	892	88	Наразин
Вода «Реггег» (стеклянная тара)	584,573	10,4	3095	280	Дигидрострепто-мицин
	462,579	4,2	2205	133	Хлортетрациклин
	787,498	10,9	1480	132	Наразин
Вода «Новлянская» (пластиковая тара)	584,637	5,1	1725	166	Дигидрострептомицин
	787,574	15,6	2037	237	Наразин
Вода колодезная (д. Афонино, Владимирской обл.)	Не обнаружено антибиотиков				
Водопроводная вода г. Владимир (Фрунзенский район)	787,718	4,5	2096	292	Наразин
Водопроводная вода г. Владимир (Юго-западный район)	Не обнаружено антибиотиков				

В пробах воды «Нарзан», «Я», «Шишкин лес», «Суздальские напитки», «Липецкий бювет», «Реггег», «Новлянская», приобретенных в розничной торговой сети г. Владимира, обнаружено присутствие наразина, хлортетрациклина, тетрациклина, дигидрострептомицина, в водопроводной воде обнаружен

наразин. Макролиды практически на всех спектрах проб воды представлены ионами  $[M + Na]^+$ ,  $[M + K]^+$ , а тетрациклины – ионами  $[M + H - NH_3 - H_2O]^+$  (табл. 3, рис. 1).

Возможность количественного анализа изучали на примере наразина (E 765), как наиболее распространенного антибиотика в ветеринарии и наиболее часто встречающегося в пробах исследуемой воды. Для количественного анализа использовали метод внутреннего стандарта. В результате исследований различных антибиотиков из группы макролидов установлено, что оптимальным внутренним стандартом для наразина является джозамицин. При построении градуировочной зависимости сумму площадей пиков основных ионов наразина –  $[HPZ + Na]^+$   $m/z = 787.770$  и  $[HPZ + K]^+$   $m/z = 803.760$  делили на сумму площадей пиков

Таблица 4

Определение наразина в питьевой воде методом МС МАЛДИ ( $n = 3, P = 0,95$ )

Проба воды	Найдено, мкг/л	$s_r$
«Нарзан» (пластиковая тара)	0,69 ± 0,07	0,04
«Я» (пластиковая тара)	0,29 ± 0,06	0,09
«Новлянская» (пластиковая тара)	0,11 ± 0,01	0,06

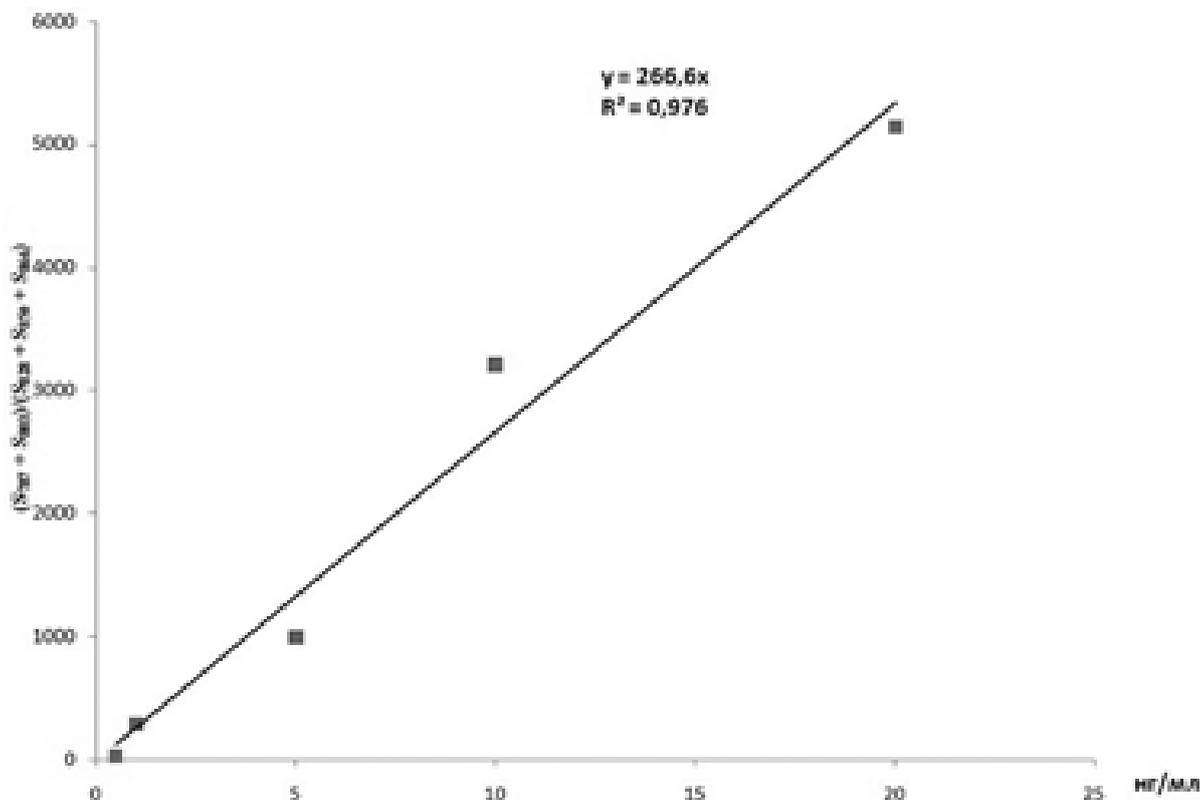


Рис. 2. Градуировочный график для определения наразина.

ионов джозамицина –  $[\text{ДЖМ} + \text{H}]^+ m/z = 828.767$ ,  $[\text{ДЖМ} + \text{K}]^+ m/z = 866.620$  и  $[\text{ДЖМ} + \text{Na}]^+ m/z = 850.644 - (S_{787} + S_{803}) / (S_{828} + S_{866} + S_{850})$ . Градуировочный график линейен в диапазоне 0,5–20 нг/мл при коэффициенте корреляции 0,976 и относительном стандартном отклонении 4–9% (рис. 2).

В табл. 4 представлены результаты определения наразина в питьевой воде. Относительное стандартное отклонение результатов анализа не превышает 0,09. На рис. 3 показан масс-спектр МАЛДИ экстракта воды «Я» с добавленным внутренним стандартом – джозамицином. О присутствии других антибиотиков и примерном их количестве можно судить по интенсивностям их сигналов в масс-спектрах (табл. 3). С учетом интенсивности и площадей пиков найденных антибиотиков можно предположить, что их концентрация выше предела обнаружения и находится в диапазоне 0,05–0,1 мкг/л.

В настоящее время в РФ отсутствует нормативная документация по нормам и методикам определения антибиотиков в бутилированной и водопроводной воде. В связи с этим в данной работе констатируем только факт присутствия антибиотиков и их количество.

## Заключение

Результаты проведенных исследований демонстрируют эффективность метода МС МАЛДИ с времяпролетным масс-анализатором при идентификации и определении антибиотиков различных групп в питьевой воде. Показана возможность как скрининга проб воды на содержание антибиотиков, так и количественное определение наразина.

## Литература

1. Hirsch R. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment / Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.-L. // *Sci. Total Environ.* 1999. V. 225. P. 109–118.
2. Kim S.-C. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed / Kim S.-C., Carlson K. // *Water Res.* 2006. V. 40. P. 2549–2560.
3. Dietze J.E. Occurrence of antibiotics in water from 13 fish hatcheries, 2001–2003 / Dietze J.E., Scribner E.A., Meyer M.T., Koplin D.W. // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2005. V. 85. P. 1141–1152.
4. Баренбойм Г.М. Загрязнение поверхностных и сточных вод лекарственными препаратами / Г.М.

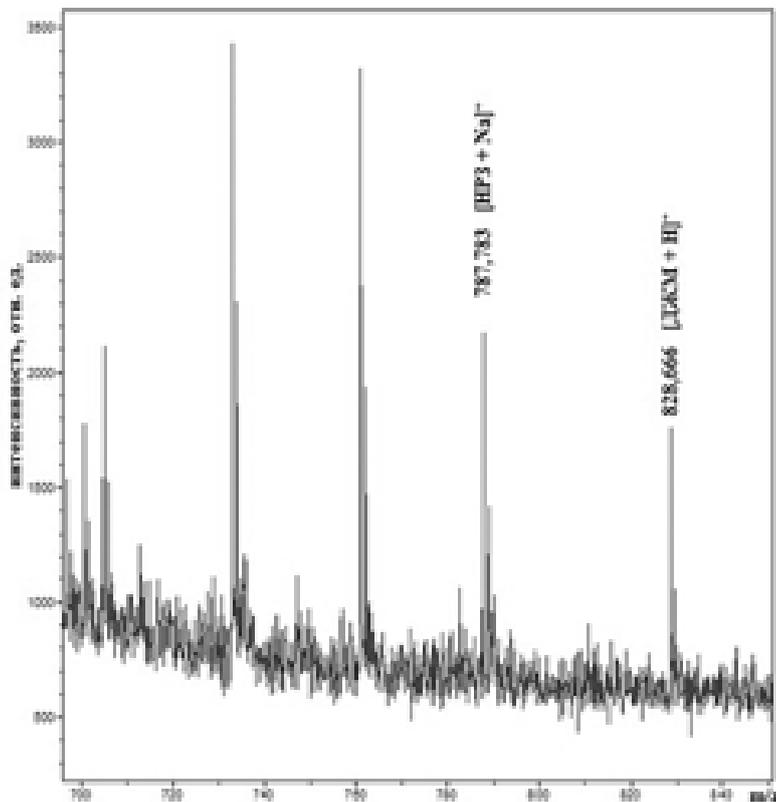


Рис. 3. Масс-спектр МАЛДИ экстракта из воды «Я» с введением внутреннего стандарта — джозамицина.

Баренбойм, М.А. Чиганова // Вода: химия и экология. 2012. №10. С. 40–46.

5. Hirsch R. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry / Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Mehlich A., Ballwanz F., Kratz K.-L // J. Chromatogr. A. 1998. V. 815. P. 213-223.

6. Cohen L. H. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry / Cohen L.H., Gusev A.I. // Anal. Bioanal. Chem. 2002. V. 373. P. 571–586.

7. Chen K.-Y. Determination of macrolide antibiotics using dispersive liquid-liquid microextraction followed by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / Chen K.-Y., Yang T.C., Chang S.Y. // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2012. V. 23. P. 1157–1160.

T.A. Krasnova, V.G. Amelin

## IDENTIFICATION AND DETECTION OF ANTIBIOTICS IN DRINKING WATER USING MASS SPECTROMETRY WITH MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION

New rapid procedures of identification of 30 residues of antibiotics in drinking water by mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization (MS MALDI) is developed. The nanosurface of standard substrates produced by Bruker Daltonic firm («Nanosys MSP 96») was used as matrixes. Acetonitrile was used to extract antibiotics from water. Detection limits were 1–3 ng/L. Relative standard deviation of the analysis results did not exceed 0.09. Duration of the analysis is 20–30 min.

**Key words:** antibiotics, water, MS MALDI