



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10888

### ВЭЖХ-МС/МС определение амоксициллина в плазме крови с использованием дериватизации

Елизавета Николаевна Гончарова<sup>1</sup>✉, Диана Эльмировна Габидуллина<sup>1</sup>,  
Ренат Наилевич Селимов<sup>1</sup>, Павел Анатольевич Коряковцев<sup>1</sup>,  
Юлия Валерьевна Карсакова<sup>1</sup>, Сергей Владимирович Козлов<sup>1</sup>,  
Александр Анатольевич Комаров<sup>1,2</sup>, Екатерина Сергеевна Енгашева<sup>1</sup>,  
Сергей Владимирович Енгашев<sup>1</sup>, Борис Вениаминович Уша<sup>2</sup>,  
Игорь Геннадьевич Гламаздин<sup>2</sup>, Дамир Исмаилович Удавлиев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НВЦ Агроветзащита, Москва, Россия, goncharova.betty@ya.ru✉

<sup>2</sup>Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

**Аннотация.** Амоксициллин (АМОХ) является широко применяемым антибиотиком, как в медицине, так и ветеринарии, поэтому задача его надежного определения в биологических матрицах, таких как, например, плазма крови остается актуальной. АМОХ является нестабильным аналитом, на его деградацию в растворах и матрицах оказывают влияние множество параметров: температура, природа растворителя, pH среды, добавление солей или кислот в экстракты. Эти факторы усложняют пробоподготовку и количественное определение амоксициллина в сложных матрицах, так как при фармакокинетическом исследовании большого числа проб или длительном анализе стабильность аналита играет немаловажную роль. Разработанная методика позволяет надежно определять амоксициллин в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС, за счет повышения его стабильности в экстрактах плазмы крови и увеличении времени удерживания на обращенно-фазных сорбентах путем дериватизации вторичным циклическим амином – пирролидином. При разработке методики рассматривали влияние многих факторов на полноту дериватизации и извлечения. Для этого варьировали pH экстрагирующего фосфатного буфера, добавляемый объем пирролидина, время дериватизации и pH экстракта перед его очисткой с помощью твердофазной экстракции. Условия методики были оптимизированы так, чтобы достичь хорошего извлечения – не ниже 80%. При ВЭЖХ-МС/МС анализе детектируемым веществом является дериват, который имеет молярную массу 436 г/моль. Конечный аналит детектируется в отрицательном режиме ионизации с  $m/z$  435.3, при фрагментировании дает ионы-продукты с  $m/z$  263.1; 357.2 и 340.1. Дериватизация позволила улучшить удерживание определяемого аналита на обращенно-фазовом сорбенте. Хроматографическое разделение при этом занимает 9 минут и проходит в градиентном режиме элюирования. При этом известно, что сам амоксициллин в экстрактах плазмы крови в автосамплере в течение суток деградирует более чем на 20%, его дериват в этих условиях остается стабильным.

**Ключевые слова:** амоксициллин, плазма крови, ВЭЖХ-МС/МС, дериватизация.

**Благодарности:** соглашение между Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России) и ООО «НВЦ Агроветзащита С-П.» о предоставлении из федерального бюджета субсидии на развитие кооперации российской образовательной организации высшего образования и организации реального сектора экономики в целях реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства «Разработка инновационных средств защиты здоровья сельскохозяйственных животных и внедрение их в производство», выполняемого с участием Московского государственного университета пищевых производств (ФГБОУ ВО «МГУПП») от 14 декабря 2020 г. № 075-11-2020-033.

**Для цитирования:** Гончарова Е.Н., Габидуллина Д.Э., Селимов Р.Н., Коряковцев П.А., Карсакова Ю.В., Козлов С.В., Комаров А.А., Енгашева Е.С., Енгашев С.В., Уша Б.В., Гламаздин И.Г., Удавлиев Д.И. ВЭЖХ-МС/МС определение амоксициллина в плазме крови с использованием дериватизации // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 816-828. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10888>



Original article

## HPLC-MS/MS determination of amoxicillin in blood plasma using derivatization

Elizaveta N. Goncharova<sup>1</sup>✉, Diana E. Gabidullina<sup>1</sup>, Renat N. Selimov<sup>1</sup>, Pavel A. Koryakovtsev<sup>1</sup>, Yulia V. Karsakova<sup>1</sup>, Sergey V. Kozlov<sup>1</sup>, Alexander A. Komarov<sup>1,2</sup>, Ekaterina S. Engasheva<sup>1</sup>, Sergey V. Engashev<sup>1</sup>, Boris V. Usha<sup>2</sup>, Igor G. Glamazdin<sup>2</sup>, Damir I. Udavliev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NVC Agrovetzashita, Moscow, Russian Federation, goncharova.betty@ya.ru✉

<sup>2</sup>Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Amoxicillin (AMOX) is an antibiotic widely used both in general medicine and veterinary medicine that is why it is very important to enable its reliable determination in biological matrices, such as blood plasma. AMOX is an unstable analyte, its degradation in solutions and matrices is influenced by many parameters: temperature, the nature of the solvent, the pH of the medium, salts or acids added to the extracts. These factors impair sample preparation and the quantification of amoxicillin in complex matrices since analyte stability plays an important role in the pharmacokinetic study of a large number of samples or a long-term analysis. The developed method allows reliably determining amoxicillin in blood plasma by HPLC-MS/MS. It involves increasing amoxicillin stability in blood plasma extracts and increasing the retention time on reverse-phase sorbents by derivatisation with a secondary cyclic amine (pyrrolidine). The developed methodology considers the influence of many factors on the completeness of derivatisation and extraction. For this, we varied the pH of the extracting phosphate buffer, the added volume of pyrrolidine, the derivatisation time, and the pH of the extract before it was purified by solid-phase extraction. The method's conditions were optimised to achieve a good recovery of at least 80%. During HPLC-MS/MS analysis, the detectable substance was a derivative, with a molar mass of 436 g/mol. The final analyte was detected in the negative ionisation mode with  $m/z=435.3$ , during fragmentation it produced product ions with  $m/z=263.1$ , 357.2, and 340.1. Derivatisation allowed improving the retention of the determined analyte on the reverse-phase sorbent. Chromatographic separation took 9 minutes and took place in a gradient elution mode. At the same time, amoxicillin in blood plasma extracts in the autosampler degraded by more than 20% in 24 hours and its derivative remained stable under these conditions.

**Keywords:** amoxicillin, blood plasma, HPLC-MS/MS, derivatisation.

**Acknowledgments:** agreement between the Ministry of Education and Science of the Russian Federation and OOO NVC Agrovetzashita S-P on providing subsidies from the federal budget to develop cooperation between a Russian educational organisation of higher education and an organisation of the real sector of the economy in order to implement a comprehensive project to create high-tech production “Development of innovative means of protecting the health of farm animals and their introduction into the production” carried out with the participation of Moscow State University of Food Production of 14 December 2020 No. 075-11-2020-033.

**For citation:** Goncharova E.N., Gabidullina D.E., Selimov R.N., Koryakovtsev P.A., Karsakova Yu.V., Kozlov S.V., Komarov A.A., Engasheva E.S., Engashev S.V., Usha B.V., Glamazdin I.G., Udavliev D.I. HPLC-MS/MS determination of amoxicillin in blood plasma using derivatisation. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(6): 816-828. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10888>

### Введение

Амоксициллин (АМОХ) – полусинтетический антибиотик группы пенициллинов, обладающий широким спектром антимикробного действия, активный в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [1, 2]. АМОХ нашел широкое применение

как для лечения людей, так и животных, поэтому актуальна задача его контроля в различных биологических матрицах. В литературе описаны многие способы анализа амоксициллина в плазме крови, молоке, яйцах, в тканях и органах животных [3-14]. АМОХ является нестабильным аналитом, на его деградацию в растворах

и матрицах оказывают влияние множество параметров: температура, природа растворителя, pH среды, добавление солей или кислот в экстракты [15-20]. Эти факторы усложняют пробоподготовку и количественное определение амоксициллина в сложных матрицах, так как при фармакокинетическом исследовании большого числа проб или длительном анализе стабильность аналита играет немаловажную роль.

Помимо нестабильности аналита в пробах и экстрактах, его определение с помощью жидкостной хроматографии затрудняет тот факт, что АМОХ является полярным соединением. Это влияет на выбор неподвижной фазы, так как из-за низкого сродства к неполярным фазам (C18, C8) амоксициллин плохо удерживается на сорбенте и выходит из колонки с мертвым объемом [18, 21]. Использование обращенно-фазовой хроматографии ограничивается еще и тем, что основным элюентом в данном методе является метанол, с которым амоксициллин образует аддукт [22]. Взаимодействие с метанолом с образованием эфиров [23] является общим свойством пенициллинов, что также ограничивает возможность применения метанола при подготовке проб, так как это ведет к потере целевых соединений. В нескольких работах, ввиду нестабильно-

сти амоксициллина, применяется быстрая пробоподготовка образцов с использованием ацетонитрила [24] или буфера дигидрофосфата калия [25] в качестве экстрагента, который используют для анализа без последующей очистки.

Для определения на спектральных детекторах и стабилизации бета-лактамных антибиотиков проводят дериватизацию, например, используя уксусный ангидрид и 1-метилимидазол с хлоридом ртути [26], формальдегид с трихлоруксусной кислотой [27], бензойный ангидрид с последующей обработкой экстракта 1,2,4-триазолом и хлоридом ртути (II) [28]. В статье [16] проводят дериватизацию амоксициллина с помощью пиперидина и определяют его в органах и тканях животных. Во всем мире пиперидин относится к прекурсорам наркотических веществ [29], и его оборот на территории РФ находится под серьезными ограничениями [30]. В нашей работе был разработан метод дериватизации амоксициллина в плазме крови животных, основанный на его взаимодействии с пирролидином, как вторичным амином, который не является прекурсором. Полученный дериват стабилен во время пробоподготовки в органических растворителях, в конечном экстракте и удерживается на обращенно-фазовом сорбенте (рис. 1). Разработанная методика может широко использоваться

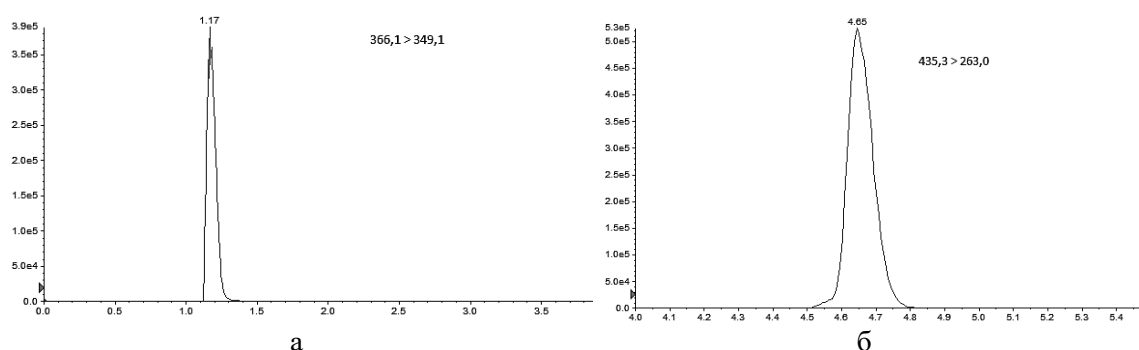


Рис. 1. Хроматограмма амоксициллина (100 нг/см<sup>3</sup>, а) и деривата амоксициллина пирролидином (100 нг/см<sup>3</sup>, б) на колонке C18. Фаза А 0.5% муравьиная кислота в воде, фаза Б 0.5% муравьиная кислота в метаноле.

Fig. 1. Chromatogram of amoxicillin (100 ng/cm<sup>3</sup>, a) and pyrrolidine derivative of amoxicillin (100 ng/cm<sup>3</sup>, b) on a C18 column. Phase A: 0.5% formic acid in water, phase B: 0.5% formic acid in methanol.



для биоаналитических и фармакокинетических исследований, в том числе при работе с большим количеством проб.

### Экспериментальная часть

**Материалы и реагенты.** Аналитический стандарт амоксициллина тригидрата был получен от LGC (Великобритания), внутренний стандарт амоксициллина-Д4 (АМОХ-Д4) от TRC (Канада). В работе также использовали муравьиную кислоту с чистотой 98% (Scharlau, Испания), уксусную кислоту с чистотой 99.8% (Carl Roth, Германия), метанол для ВЭЖХ с чистотой 99.0%, пирролидин с чистотой 99% (ПраймКемикалсГрупп, Россия), натрий фосфорно-кислый 2-замещенный 12-водный с чистотой 98% (РусХим, Россия), соляную кислоту с содержанием 36.9% (Сигма Тек, Россия), ацетат аммония для ВЭЖХ-МС (Scharlau, Испания), ацетонитрил с чистотой 99.0%, деионизованную воду, полученную с помощью системы очистки воды Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA), ортофосфорную кислоту 85% (Scharlau, Испания), гидроксид натрия с чистотой не менее 99% (Экос.1, Россия), картриджи Sorurge C18 (Biosomma, Китай).

**ВЭЖХ-МС/МС анализ.** Для определения использовали жидкостной хроматограф с гибридным масс-спектрометрическим детектором QTRAP 5500 (Sciex, США), объединяющим в себе возможности тройного квадруполя и линейной ионной ловушки с ионизацией электро-распылением. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке с обращено-фазовым сорбентом Synergi Fusion-RP (50 мм x 2 мм; 4 мкм, Phenomenex, США) с использованием предколонки SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 2.1 мм (Phenomenex, США). В качестве подвижной фазы А использовали 0.5% раствор муравьиной кислоты в воде, в качестве подвижной фазы В – 0.5% раствора муравьиной кислоты в метаноле. Разделение осуществляли в градиентном

режиме элюирования. Программа градиентного элюирования для амоксициллина и его деривата была одинаковая. Время анализа занимало 9 минут, с 0 до 0.4 минут содержание фазы Б было 0%, с 0.4 до 4.2 минут содержание фазы увеличивалось с 0 до 100% и держалось на этом значении 2 минуты, далее с 6.21 минуты в течение 2.79 минут колонку уравнивали 100% подвижной фазой А. Температура термостата колонки при анализе составляла 30°C, скорость потока 0.2 см<sup>3</sup>/мин. Объем инъекции 5 мм<sup>3</sup>.

Параметры настройки масс-спектрометра использовали рекомендуемые производителем: давление газа завесы (CUR) 20 рсі, напряжение на интерфейсе (IS) - 4500 В, температура интерфейса (TEM) 400°C, давление газа-распылителя (GS1) 40 рсі, давление газа-осушителя (GS2) 40 рсі. Детектирование аналитов проводили методом MRM. Параметры масс-спектрометра приведены в таблице 1.

**Растворы стандартных образцов.** Исходные растворы внешнего и внутреннего стандартов с концентрацией 1 мг/см<sup>3</sup> готовили растворением точной навески в деионизованной воде. Для предотвращения деградации амоксициллина при многократных циклах разморозки и заморозки исходного раствора, раствор внешнего стандарта (1 мг/см<sup>3</sup>) разливали по 50 мм<sup>3</sup> в эппендорфы, из которых в дальнейшем в день использования последовательным разбавлением деионизованной водой готовили рабочие растворы с концентрацией 10 и 1 мкг/см<sup>3</sup>. Из исходного раствора внутреннего стандарта готовили рабочие растворы с концентрациями 10 и 1 мкг/см<sup>3</sup>. Приготовленные исходные растворы хранили в течение месяца при температуре -80°C для минимизации деградации.

**Дериватизация амоксициллина.** Дериватизацию амоксициллина проводили пирролидином, опираясь на метод, описанный в статье [16]. Для этого отбирали точную навеску аналита от 2 до 7 мг, до

Таблица 1. Параметры настройки масс-спектрометра QTRAP 5500 (DP – потенциал декластеризации, CE – энергия соударения, CXP – потенциал на выходе из ячейки соударения) при определении амоксициллина и его деривата.

Table 1. Settings of the QTRAP 5500 mass spectrometer ((DP) declustering potential, (CE) collision energy, (CXP) collision cell exit potential when determining amoxicillin and its derivative.

Вещество	Ион пре-курсор, m/z	Полярность	Ион продукт, m/z	DP, V	CE, V	CXP, V
Амоксициллин	366.1	+	349.1*	50	15	19
			208.1	50	21	19
Амоксициллин дериват	435.3	–	263.0*	-40	-30	-19
			357.1	-40	-20	-19
			340.1	-40	-25	-19
Амоксициллин-Д4 дериват	439.3	–	263.0*	-40	-30	-19
			361.1	-40	-20	-19

\* - наиболее интенсивный MRM-переход, использующийся для количественного определения.

бавляли 1 см<sup>3</sup> воды и 20 мм<sup>3</sup> пирролидина. После полного растворения амоксициллина полученную смесь оставляли при перемешивании на 30 минут. Затем для доведения pH раствора до нейтрального добавляли 180 мм<sup>3</sup> 1М уксусной кислоты. К полученному раствору деривата амоксициллина добавляли 25мМ ацетат аммония в воде до получения концентрации эквивалентной 1 мг/см<sup>3</sup> исходного амоксициллина. Доведение pH раствора до нейтрального позволяет использовать полученный стандарт для приготовления конечных экстрактов плазмы крови с добавкой деривата, чтобы вычислять извлечение аналита. Для контроля полноты проведения реакции анализировали полученный стандарт с помощью ВЭЖХ-МС/МС, детектируя MRM-переходы для самого амоксициллина и его деривата. Дериват внутреннего стандарта готовили аналогичным способом, используя амоксициллин-Д4.

Пробоподготовка плазмы крови. Отбирали 0.3 см<sup>3</sup> образца плазмы крови в пробирку. Вносили 100 мм<sup>3</sup> раствора внутреннего стандарта амоксициллина-Д4 (1 мкг/см<sup>3</sup>) и 3 см<sup>3</sup> раствора фосфатного буфера (100 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) и перемешивали 5 минут. В пробирку добавляли 50 мм<sup>3</sup> пирролидина и проводили дериватизацию в течение 30 минут при

перемешивании. pH полученного экстракта доводили до 3, добавлением 2М HCl (pH контролировали индикаторной лакмусовой бумагой). Перемешивали содержимое пробирки 5 минут и центрифугировали 10 минут при 4500 об/мин. Супернатант очищали с помощью твердофазной экстракции. Для этого использовали картриджи с сорбентом C18 (200 мг), предварительно последовательно промытые 3 см<sup>3</sup> метанола и 3 см<sup>3</sup> воды. После нанесения анализируемого образца картридж промыли 6 см<sup>3</sup> деионизованной воды и сушили. Далее элюировали анализируемое вещество 3 см<sup>3</sup> метанола. Элюат упаривали в токе азота при 40°C досуха. После упаривания сухой остаток перерастворяли в 1 см<sup>3</sup> деионизованной воды. Полученный экстракт использовали для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

### Обсуждение результатов

Реакция дериватизации. Для дериватизации амоксициллина используется пирролидин, схема реакции приведена на рисунке 2. Данная реакция проходит в щелочной среде, которую пирролидин образует в водном растворе. Реакция проходит количественно, аналогичным образом дериватизации подвергается внутренний стандарт. При ВЭЖХ-МС/МС анализе детектируемым веществом является дериват, который имеет молярную

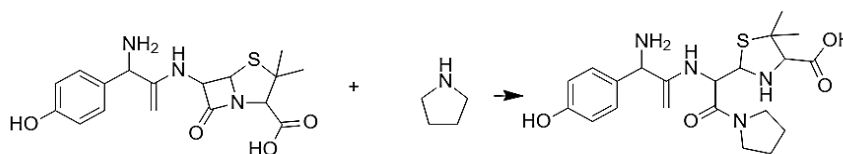


Рис. 2. Схема реакции дериватизации амоксициллина пирролидином.  
 Fig. 2. Scheme of the reaction of amoxicillin derivatisation with pyrrolidine.

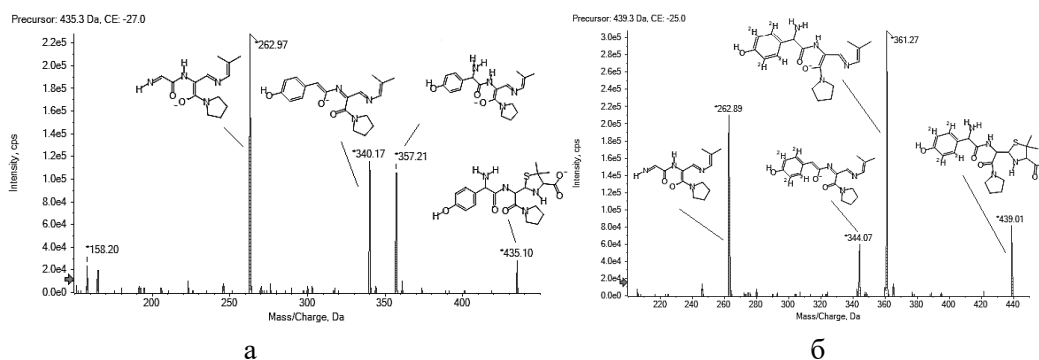


Рис. 3. Спектры МС/МС фрагментации продукта дериватизации амоксициллина (а) и амоксициллина-Д4 (б) с пирролидином в отрицательном режиме регистрации ионов.  
 Fig. 3. MS/MS spectra of the fragmentation of the product of amoxicillin (a) and amoxicillin-D4 (b) derivatisation with pyrrolidine in the mode of registering negative ions.

массу 436 г/моль. Спектр продукта реакции дериватизации амоксициллина с пирролидином представлен на рисунке 3. Конечный аналит детектируется в отрицательном режиме ионизации с  $m/z$  435.3, при фрагментировании дает ионы-продукты с  $m/z$  263.1; 357.2 и 340.1.

Стабильность деривата амоксициллина при упаривании. Пробоподготовка таких сложных матриц как сыворотка или плазма крови часто подразумевает использование упаривания до или после ТФЭ. Поэтому изучали стабильность деривата амоксициллина при упаривании 1 см<sup>3</sup> раствора с концентрацией аналита 100 нг/см<sup>3</sup> в ацетонитриле в токе азота при комнатной температуре, при 30°C и при 40°C, упаривание проводилось досуха и до 100 мм<sup>3</sup>. После чего сухой остаток перерастворяли в 1 см<sup>3</sup> деионизованной воды, концентрат доводили до 1 см<sup>3</sup> деионизованной водой. В таблице 2 представлены результаты относительно исходных растворов (100 нг/см<sup>3</sup>). При упаривании при различных температурах и до различного объема конечного концен-

трата. Дериват оказался стабилен, поэтому при пробоподготовке для быстрого и удобного упаривания элюата после ТФЭ был выбран вариант, когда упаривание ведется досуха при 40°C.

Стабильность деривата амоксициллина в автосамплере. Известно, что амоксициллин в метанольных [31] и водных [27] растворах при комнатной температуре не стабилен. Важно было оценить стабильность полученного деривата в различных растворителях. Стабильность в автосамплере была изучена на уровне 50 нг/см<sup>3</sup> в воде, 50% ацетонитриле, метаноле и на уровнях 10 и 1000 нг/см<sup>3</sup> в экстракте плазмы крови (НПКО и ВПКО). Стабильность в растворителях и экстрактах рассчитывали, сравнивая абсолютные значения площадей пика в начале анализа и через 24 ч. Дополнительно изучали стабильность в экстрактах плазмы крови, которая нормировалась на внутренний стандарт. Для этого в экстрактах плазмы рассчитывали концентрации, которые рассчитывались по матричной градуировке, нормированной на внутренний

Таблица 2. Результаты исследования стабильности деривата амоксициллина при упаривании 1 см<sup>3</sup> раствора (100 нг/см<sup>3</sup> ацетонитрила) при различных температурах и до разного конечного объема раствора после упаривания относительного исходного раствора (n=4±SD).  
 Table 2. Results of the study of the stability of amoxicillin derivative during evaporation of a 1 cm<sup>3</sup> of solution (100 ng/cm<sup>3</sup> of acetonitrile) at different temperatures and up to different final volumes of the solution after evaporation relative to the initial solution (n=4±SD).

Т упаривания	R, %	
	Досуха	До 100 мм <sup>3</sup>
комнатная	94.5±1.5	95.0±1.7
30°C	96.2±1.9	95.9±2.4
40°C	96.9±1.9	96.1±1.5

Таблица 3. Изучение стабильности деривата в течение суток в автосамплере на уровне 50 нг/см<sup>3</sup> в воде, 50% ацетонитриле, метаноле и в экстракте плазмы крови на уровнях 10 и 1000 нг/см<sup>3</sup> (n=3±SD).

Table 3. Study of the derivative stability during the day in an autosampler at the level of 50 ng/cm<sup>3</sup> in water, 50% acetonitrile, methanol, and in blood plasma extract at levels of 10 and 1000 ng/cm<sup>3</sup> (n=3±SD).

Вода	50% ацетонитрил	Метанол	Экстракт плазмы крови (10 нг/см <sup>3</sup> )	Экстракт плазмы крови (1000 нг/см <sup>3</sup> )	Экстракт плазмы крови (10 нг/см <sup>3</sup> ) (с поправкой на внутренний стандарт)	Экстракт плазмы крови (1000 нг/см <sup>3</sup> ) (с поправкой на внутренний стандарт)
102±4%	107±7%	104±4%	91±4%	100±2%	88±1%	97±1%

стандарт, и сравнивали с концентрациями в этих же экстрактах, которые анализировались повторно не ранее чем через сутки после первого исследования. В промежутке между исследованиями матричные растворы и растворы в растворителях хранились при температуре от +4°C до +10°C. Во всех трех растворителях дериват амоксициллина стабилен в течение суток в автосамплере (табл. 3). В экстрактах плазмы крови стабильность деривата находится в диапазоне от 90.5 до 99.9%, при нормировании на внутренний стандарт от 87.6 до 96.8%, что удовлетворяет требованиям по валидации биоаналитических методик [32].

Оптимизация условий дериватизации в образцах плазмы крови. Для оптимизации условий параметров методики проводили пробоподготовку образцов плазмы крови (200 нг/см<sup>3</sup>) с варьированием таких параметров, как рН фосфатного буфера

для экстракции и дериватизации, добавляемое количество пирролидина, время дериватизации и рН экстракта перед нанесением на ТФЭ. Абсолютные извлечения внешнего и внутреннего стандартов оценивали путем сравнения образцов с добавкой стандартных образцов до пробоподготовки и с добавкой к холостым образцам после пробоподготовки дериватизированных стандартных образцов.

рН буферного раствора для экстракции и дериватизации. При изучении влияния рН фосфатного буфера на протекание реакции и на извлечение АМОХ и АМОХ-D4 готовили 5 различных буферов 100 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> со значениями рН 6, 7, 8, 9, 10. рН доводили с помощью концентрированной ортофосфорной кислоты и 3М NaOH. Дальнейшая пробоподготовка образцов велась в одинаковых условиях, включая стадию дериватизации. Абсолютные извлечения внешнего и

Таблица 4. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при варьировании pH фосфатного буфера (n=3±SD).

Table 4. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma at pH variations of the phosphate buffer (n = 3±SD).

Аналит	R, %				
	pH фосфатного буфера				
	6	7	8	9	10
Амоксициллин	68.7±3.4	72.8±1.5	64.1±1.3	57.8±0.8	43.1±1.3
Амоксициллин-Д4	74.5±1.9	78.2±0.9	70.3±1.4	63.8±0.4	50.5±1.9

Таблица 5. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при разном добавляемом объеме пирролидина для дериватизации (n=3±SD).

Table 5. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma with different added volumes of pyrrolidine for derivatisation (n = 3±SD).

Аналит	R, %					
	Объем пирролидина, мм <sup>3</sup>					
	10	25	50	100	200	500
Амоксициллин	74.3±2.4	58.0±1.8	75.7±2.5	61.6±1.1	68.7±4.4	59.9±3.1
Амоксициллин-Д4	81.1±3.4	59.4±2.9	77.0±3.9	68.4±2.3	78.3±6.6	71.0±4.1

внутреннего стандартов при разных значениях pH фосфатного буфера приведены в таблице 4. Наибольшее извлечение амоксициллина и его дейтерированного аналога наблюдалось при использовании для экстракции и среды для дериватизации фосфатного буфера с pH 7. Смещение pH в область щелочной среды приводило к существенному снижению извлечения аналитов. А смещение pH в область более кислой среды (до 6) не оказывало существенного влияния на извлечение – разница не более чем на 10% (относительно точки с pH 7), что может быть связано с не полной дериватизацией, так как для раскрытия цикла в амоксициллине и проведения реакции требуется щелочная среда. Оптимальным значением pH буфера для экстракции и дериватизации амоксициллина было выбрано 7, при котором достигается наибольшее извлечение. Сильнощелочная среда без дериватирующего агента способствует деградации амоксициллина, при pH 10 извлечение аналита составляет менее 50%.

Содержание пирролидина. Для полного протекания реакции дериватизации необходимо достаточное количество пирролидина, в том числе для его расхода на

побочные реакции с компонентами матрицы. Изучение влияния количества дериватирующего агента на пробоподготовку подразумевало добавление различного количества пирролидина, а для остановки протекания реакции перед использованием полученных экстрактов для ТФЭ, pH экстрактов необходимо сместить в кислую среду до 3 путем добавления 2М соляной кислоты. Поэтому при разработке методики изучали извлечение аналитов при разном добавляемом количестве пирролидина: 10 мм<sup>3</sup>, 25 мм<sup>3</sup>, 50 мм<sup>3</sup>, 100 мм<sup>3</sup>, 200 мм<sup>3</sup>, 500 мм<sup>3</sup> и соответственно разном добавляемом количестве 2М соляной кислоты, поскольку добавление большего количества пирролидина приводило к необходимости добавления большего количества кислоты для смещения pH раствора в кислую среду. Дальнейшая пробоподготовка образцов проводилась согласно описанной ранее схеме. В таблице 5 приведены извлечения аналитов при добавлении разного объема пирролидина для дериватизации. В каждом случае извлечение аналитов было более 55%. При многократном избытке пирролидина не происходит существенного увеличения извлечения аналитов. Реакция протекает полностью и при меньшем



Таблица 6. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при варьировании времени дериватизации пирролидином (n=3±SD)

Table 6. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma at variation of time of derivatisation with pyrrolidine (n=3±SD).

Аналит	R, %				
	Время дериватизации, мин				
	5	10	20	30	60
Амоксициллин	67.0±3.8	80.9±11.1	72.3±2.7	74.0±2.2	74.5±0.7
Амоксициллин-Д4	70.3±4.7	84.1±12.2	79.3±3.1	80.8±3.0	82.8±1.1

Таблица 7. Извлечение (R, %) амоксициллина и амоксициллина-Д4 из плазмы крови при варьировании pH экстракта, наносимого на картридж C18 для ТФЭ (n=3±SD).

Table 7. Extraction (R, %) of amoxicillin and amoxicillin-D4 from blood plasma at pH variations of the extract applied to the C18 cartridge for SPE (n=3±SD).

Аналит	R, %					
	pH экстракта					
	2	3	4	5	6	7
Амоксициллин	81.3±3.1	82.1±5.5	72.5±3.1	71.7±1.1	65.7±0.8	71.1±7.1
Амоксициллин-Д4	81.6±1.3	79.6±4.7	72.5±2.5	73.0±1.1	68.1±0.8	72.6±7.5

избытке пирролидина. Флуктуации извлечения при изменении добавляемого объема пирролидина (от 10 до 500 мм<sup>3</sup>) вероятно могут быть связаны с деградацией самой матрицы в сильнощелочном pH и, как следствие, влиянием матричного эффекта. Оптимальным количеством пирролидина было выбрано 50 мм<sup>3</sup>.

**Время дериватизации.** Еще один фактор, оказывающий влияние на абсолютное извлечение при пробоподготовке и на полноту проведения дериватизации, является время проведения реакции. Рассматривали изменение времени протекания реакции от 5 до 60 минут. В каждом случае извлечение аналитов было более 65% (таблица 6). Наибольшее извлечение наблюдалось при проведении дериватизации в течение 10 минут. Увеличение времени дериватизации небольшим образом влияло как на полноту протекания реакции и как следствие на извлечение аналитов. Для эффективного процесса дериватизации подходящим количеством времени является 30 минут. При меньшем количестве времени разброс результатов оказывается большим. А увеличение времени дериватизации не оказывает значительного увеличения извлечения, но су-

щественно сказывается на общем времени пробоподготовки большой серии образцов.

**pH перед нанесением на ТФЭ.** Для очистки экстракта перед ВЭЖХ-МС/МС анализом в методике используются картриджи для ТФЭ с сорбентом C18 (200 мг). Для оптимизации этой стадии, чтобы не происходили потери аналита, рассматривали влияние pH экстракта, который наносится на картридж. Дериват удерживается на сорбенте C18 при нанесении в водном растворе с кислым pH. Поэтому варьировали pH в диапазоне от 2 до 7, pH доводили раствором 2М HCl и контролировали с помощью индикаторной лакмусовой бумаги. Как видно из таблицы 7, при увеличении pH происходит уменьшение извлечения аналита. Работа на критической границе устойчивости сорбента C18 (при pH 2) не является оптимальным вариантом для рутинного анализа. Поэтому в нашей методике pH экстракта, который наносится на картридж, был выбран равным 3.

### Заключение

Дериватизация амоксициллина и амоксициллина-Д4 с помощью пирролидина позволяет избавиться от проблемы



нестабильности исходного анализа. Разработанная методика позволяет стабильно и воспроизводимо определять амоксициллин в плазме крови с извлечением более 80%. Аналитический диапазон определения амоксициллина в плазме крови составил от 10 до 1000 нг/см<sup>3</sup>. На рисунке 4 представлены хроматограммы бланка плазмы крови и образца с концентрацией анализа на уровне НПКО (10 нг/см<sup>3</sup>). Межсерийная прецизионность (n=9 для каждой из 6 точек градуировочной зависимости) варьировалась от 1.8 до 11.3%, правильность (n=9) – от -2.7 до 5.0%. Влияние эффекта матрицы составляло 91%. Разработанная методика была апробирована при изучении фармакокинетики амоксициллина у коров, свиней, овец и кур. В ходе экспериментальной работы было выполнено 23 аналитические серии по определению амоксициллина в

плазме крови разных видов животных с использованием контрольных образцов на 4 уровнях, входящих в аналитический диапазон: 20, 250, 400, 750 нг/см<sup>3</sup> плазмы. Для каждого уровня концентраций выполняли анализ не менее 2 параллельных образцов контроля качества. Всего одна серия включала 8 образцов контроля качества. В ходе работы было проанализировано 184 образцов контроля качества, из которых только 2 образца имели отклонение найденной концентрации от номинальной более  $\pm 15\%$ .

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

### Список литературы/References

1. Komarov A.A., Engashev S.V., Engasheva E.S., Udavliev D.I., Egorov M.A., Usha B.V., Selimov R.N., Glamazdin I.G. Amoxicillin and Acidic Acid: Effective Medicines for Animal Health Protection. *Storage and processing of Farm Products*. 2021; 4; 98-117. <https://doi.org/10.36107/spfp.2021.259>

2. De Marco B.A., Natori J.S.H., Fanelli S., Tótolí E.G., Salgado H.R.N. Characteristics, Properties and Analytical Methods of Amoxicillin: A Review with Green Approach. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2017; 47: 267-277. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1281097>

3. Chen L., Wang B., Diao Z., Zhao M., Xie K., Zhang P., Wang, J. Development and Validation of an HPLC-ESI/MS/MS Method for the Determination of Amoxicillin, Its Major Metabolites, and Ampicillin Residues in Chicken Tissues. *Molecules*. 2019; 24(A): 2652. <https://doi.org/10.3390/molecules24142652>

4. De Baere S., Cherle M., Baert K., De Backer P. Quantitative Analysis of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Animal Tissues by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2002; 74: 1393-1401. <https://doi.org/10.1021/ac010918o>

5. De Baere S., Wassink P., Croubels S., Boever S.D., Baert K., Backer P.D. Quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of amoxicillin in broiler edible tissues. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 529: 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.09.069>

6. Delis G., Batzias G., Kounenis G., Koutsovití-Papadopoulou M. Application and validation of a LC/fluorescence method for the determination of amoxicillin in sheep serum and tissue cage fluid. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 49: 375-380. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.019>

7. Purohit T.J., Wu Z., Hanning S.M. Simple and reliable extraction and a validated high performance liquid chromatographic assay for quantification of amoxicillin from plasma. *J. Chromatogr. A*. 2020;



- 1611(A): 460611.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460611>
8. Liu C., Wang H., Jiang Y., Du Z. Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879; 533-540.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.01.016>
9. Lim J.W., Jung M.H., Jung S.J., Kim D.H., Park K.H., Kang S.Y. The efficacy of amoxicillin sodium against streptococcosis in cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* and its pharmacokinetics. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2016; 40; 77-87.  
<https://doi.org/10.1111/jvp.12321>
10. Reyns T., De Boever S., De Baere S., De Backer P., Croubels S. Tissue Depletion of Amoxicillin and Its Major Metabolites in Pigs: Influence of the Administration Route and the Simultaneous Dosage of Clavulanic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 448-454. <https://doi.org/10.1021/jf072398p>
11. Zhang C., Zeng J., Xiong W., Zeng Z. Rapid determination of amoxicillin in porcine tissues by UPLC-MS/MS with internal standard. *J. of Food Composition and Analysis.* 2020; 92(A): 103578. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103578>
12. Anfossi P., Zaghini A., Grassigli G., Menotta S., Fedrizzi G. Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2002; 25; 329-334. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2002.00428.x>
13. Ozdemir Z., Tras B., Uney K., Eser Faki H., Besoluk T.M. Determination of milk/plasma ratio and milk and plasma pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular administration in lactating cows. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2019; 42: 45-51. <https://doi.org/10.1111/jvp.12713>
14. Kandeel M. Pharmacokinetics and oral bioavailability of amoxicillin in chicken infected with caecal coccidiosis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 2015; 38: 504-507. <https://doi.org/10.1111/jvp.12205>
15. Berendsen B.J.A., Elbers I.J.W., Stolker A.A.M. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011; 28: 1657-1666. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.604045>
16. Van Holthoon F., Mulder P.P., Van Bennekom E.O., Heskamp H., Zuidema T., Van Rhijn H.J. Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 396; 3027-3040. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3523-0>
17. Riediker S., Stadler R.H. Simultaneous Determination of Five  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Bovine Milk Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2001; 73(7): 1614-1621. <https://doi.org/10.1021/ac0011383>
18. Freitas A., Barbosa J., Ramos F. Determination of Amoxicillin Stability in Chicken Meat by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods.* 2011; 5: 471-479. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9267-4>
19. Sun L., Jia L., Xie X., Xie K., Wang J., Liu J., Wang J. Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2016; 192; 313-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.02>
20. Kaur M.P., Rao R., Nanda S. Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011; 3: 30-37.
21. Bogialli S., Capitolino V., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., Sergi M. Simple and Rapid Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Confirmatory Assay for Determining Amoxicillin and Ampicillin in Bovine Tissues and Milk. *J. Agric. Food*



- Chem.* 2004; 52; 3286-3291.  
<https://doi.org/10.1021/jf0499572>
22. Grujic S., Vasiljevic T., Lausevic M., Ast T. Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007; 22: 67-74.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.3333>.
23. Bruno F., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M., Samperi R. Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2001; 15: 1391-1400.  
<https://doi.org/10.1002/rcm.381>
24. Abdulla A., Bahmany S.A., Wijma R., van der Nagel B.C.H., Koch B.C.P. Simultaneous determination of nine  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma by an ultrafast hydrophilic-interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. 2017; 1060: 138-143.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.014>
25. Reyns T., Cherlet M., De Baere S., De Backer P., Croubels S. Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues. *J. Chromatogr. B*. 2008; 861(1): 108-116.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.007>
26. De Brito R.B., Junqueira R.G. Determination of Beta-Lactam Residues in Milk by High Performance Liquid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2006; 49: 41-46. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000200007>
27. De Baere S., De Backer P. Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*. 2007; 586; 319-325.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.036>
28. Verdon E., Couëdor P. Multiresidue Analytical Method for the Determination of Eight Penicillin Antibiotics in Muscle Tissue by Ion-Pair Reversed-Phase HPLC after Precolumn Derivatization. *J. AOAC INTERNATIONAL*. 1999; 82: 1083-1095.  
<https://doi.org/10.1093/jaoac/82.5.1083>
29. Krasnyj spisok (19-e izdanie, janvar' 2022 goda). Prilozhenie k ezhegodnoj informacii o veshhestvah, chasto ispol'zuemyh pri nezakonnom izgotovlenii narkoticheskikh sredstv i psihotropnyh veshhestv (Forma D). V sootvetstvii s Konvenciej Organizacii Obedinennyh Nacij o bor'be protiv nezakonnogo oborota narkoticheskikh sredstv i psihotropnyh veshhestv 1988 goda. Podgotovlen Mezhdunarodnym komitetom po kontrolju nad narkotikami. Vienna International Centre P.O. Box 500 1400 Vienna, Austria.
30. O vnesenii izmenenij v perechen' narkoticheskikh sredstv, psihotropnyh veshhestv i ih prekursorov, podlezhashhih kontrolju v Rossijskoj Federacii: postanovlenie Pravitel'stva RF ot 03.06.2010 g. № 398. Sobranie zakonodatel'stva RF. 1998. No 27. St. 3198; 2010, No 17. St. 2100.
31. Bahmany S., Abdulla A., Ewoldt T. M.J., Oehlers P.L., de Winter B.C.M., Koch B.C.P. High-throughput analysis for the simultaneous quantification of nine beta-lactam antibiotics in human plasma by UPC2-MS/MS: Method development, validation, and clinical application. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022; 219: 1-8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114904>
32. EMEA. Guideline in bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London. 2011.

### Информация об авторах / Information about the authors

**Е.Н. Гончарова** – к.х.н., старший научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**Д.Э. Габидулина** – научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**E.N. Goncharova** – Ph.D (chemistry), senior researcher NVC Agrovetzashita LLC, Moscow, Russian Federation, E-mail: [goncharova.betty@ya.ru](mailto:goncharova.betty@ya.ru)

**D.E. Gabidullina** – researcher NVC Agrovetzashita LLC, Moscow, Russian Federation



**Р.Н. Селимов** – к.в.н., заведующий биоаналитической лабораторией ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**П.А. Коряковцев** – научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**Ю.В. Карсакова** – научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**С.В. Козлов** – старший научный сотрудник ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**А.А. Комаров** – д.б.н., профессор РАН, профессор кафедры ветеринарной медицины, Московский государственный университет пищевых производств, Москва, директор центра доклинических исследований ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**Е.С. Енгашева** – д.б.н., директор по науке ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**С.В. Енгашев** – д.в.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ООО «НВЦ Агроветзащита», Москва, Россия

**Б.В. Уша** – д.в.н., профессор, академик РАН, научный руководитель института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, Московский государственный университет пищевых производств, Москва

**Д.И. Удавлиев** – д.б.н., профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия

**И.Г. Гламаздин** – д.в.н., профессор, директор института ветеринарии, ветеринарно-санитарной экспертизы и агробезопасности, Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

**R.N. Selimov** – Ph.D (veterinary medicine), head of the analytical laboratory NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**P.A. Koriakovtsev** – researcher NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**Yu.V. Karsakova** – researcher NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**S.V. Kozlov** – senior researcher NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**A.A. Komarov** – grand Ph.D (biology), Professor of the Russian Academy of Sciences, Professor of the Department of Veterinary Medicine, Moscow State University of Food Production, Moscow, Director of the Center for Preclinical Research NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**E.S. Engasheva** – grand Ph.D (biology), Director of Science NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**S.V. Engashev** – grand Ph.D (veterinary medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, General Director NVC Agrovetszashita LLC, Moscow, Russian Federation

**B.V. Usha** – grand Ph.D (veterinary medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director of the Institute of Veterinary Medicine, Veterinary and Sanitary Expertise and Agro-Safety of the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

**D.I. Udavliev** – grand Ph.D (biology), Professor of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise and Biological Safety of the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

**I.G. Glamazdin** – grand Ph.D (veterinary medicine), Professor, Director of the Institute of Veterinary Medicine, Veterinary and Sanitary Expertise and Agro-Safety of the Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

*Статья поступила в редакцию 13.11.2022; одобрена после рецензирования 16.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.*

*The article was submitted 13.11.2022; approved after reviewing 16.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.*