

© НЕКРАСОВА Л.П., КУЛЕШОВА О.Ю., 2024



Некрасова Л.П., Кулешова О.Ю.

Определение антибиотиков тетрациклиновой группы в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на диодно-матричном детекторе с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции

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

РЕЗЮМЕ

Введение. Загрязнение окружающей среды антибиотиками является серьёзной экологической угрозой, представляющей опасность для здоровья человека. Мониторинг содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в объектах окружающей среды и контроль технологических процессов, направленных на их утилизацию, требуют доступных методов анализа.

Цель исследования. Разработка метода определения антибиотиков тетрациклиновой группы в воде на диодно-матричном детекторе с предварительным твердофазным концентрированием.

Материалы и методы. Объектами исследования были модельные растворы миноциклина, тетрациклина, окситетрациклина, демеклоциклина, метациклина и доксициклина в деионизованной, водопроводной, природной и очищенной сточной воде. Для твердофазной экстракции (ТФЭ) использовали картриджи Диапак П и Диапак ПГ. ТФЭ проводили с использованием манифолда VacMaster-10 (Biotage). Хроматографическое разделение проводили на колонках Diaspher C10CN и Kromasil Eternity 250 × 4,6 мм на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technology).

Результаты. Подобраны оптимальные условия хроматографического разделения миноциклина, тетрациклина, окситетрациклина, демеклоциклина, метациклина и доксициклина: изократический режим, длина волны 350 нм, подвижная фаза — смесь ацетонитрила и водного раствора фосфорной кислоты (pH = 3,0). Время анализа на колонках Diaspher C10CN и Kromasil Eternity составляло 12 и 14 мин соответственно. Достоверность линейной аппроксимации в обоих случаях была больше 0,99, однако угловые коэффициенты на колонке Kromasil Eternity были в 1,35–1,65 раза выше, чем на Diaspher C10CN. Степень извлечения тетрациклинов из деионизованной воды на картриджах Диапак П и Диапак ПГ составляла 90–95%, из водопроводной — 61–89%, из очищенной сточной — 51–87%.

Ограничения исследования. Метод непригоден для водных объектов с содержанием тетрациклинов менее 2 мкг/дм³.

Заключение. Разработана ВЭЖХ-методика определения миноциклина, тетрациклина, окситетрациклина, демеклоциклина, метациклина и доксициклина в воде с предварительным ТФЭ концентрированием на картриджах Диапак П и Диапак ПГ. Нижний предел определения при сорбции целевых соединений из 0,1 дм³ пробы составил 2 мкг/дм³.

Ключевые слова: ВЭЖХ; ТФЭ; миноциклин; тетрациклин; окситетрациклин; демеклоциклин; метациклин; доксициклин

Соблюдение этических стандартов. Исследование не требует заключения комитета по биомедицинской этике.

Для цитирования: Некрасова Л.П., Кулешова О.Ю. Определение антибиотиков тетрациклиновой группы в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на диодно-матричном детекторе с предварительным концентрированием методом твердофазной экстракции. *Гигиена и санитария*. 2024; 103(3): 266–272. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-3-266-272> <https://elibrary.ru/qfzsq>

Для корреспонденции: Некрасова Лариса Петровна, кандидат хим. наук, вед. науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии. E-mail: L.Nekrasova@cspmpz.ru

Участие авторов: Некрасова Л.П. — концепция и дизайн исследования, написание текста, сбор материала и обработка данных, редактирование; Кулешова О.Ю. — сбор материала и обработка данных, статистическая обработка. *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 поддержано государственным контрактом «Проведение аналитического обзора для определения приоритетных химических поллютантов в сточных водах мегаполиса и водных объектах, ими загрязнённых».

Поступила: 09.10.2023 / Поступила после доработки: 14.02.2024 / Принята к печати: 11.03.2024 / Опубликовано: 10.04.2024

Larisa P. Nekrasova, Oksana Ju. Kuleshova

Determination of antibiotics of the tetracycline group in water by high-performance liquid chromatography on a diode matrix detector with preliminary concentration by solid-phase extraction

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Antibiotic contamination of the environment is a serious environmental threat that poses a hazard to human health. To monitor the content of tetracycline antibiotics in environmental objects and control technological processes aimed at their disposal, accessible analytical methods are needed.

Purpose of the study. Development of a method for determining antibiotics of the tetracycline group in water using a diode array detector with preliminary solid-phase concentration.

Material and methods. The objects of the study were model solutions of minocycline, tetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, metacycline, and doxycycline in deionized, tap, natural, and treated wastewater. For solid-phase extraction, Diapak P and Diapak PG cartridges were used. SPE was performed using a VacMaster-10 manifold (Biotage). Chromatographic separation was carried out on Diasphere C10CN and Kromasil Eternity 250 × 4.6 mm 5 μm columns on an Agilent 1100 liquid chromatograph (Agilent Technology).

Results. Optimal conditions for the chromatographic separation of minocycline, tetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, metacycline, and doxycycline were selected: isocratic mode, wavelength of 350 nm, mobile phase — acetonitrile: aqueous solution of phosphoric acid (pH = 3.0). The analysis time on Diasphere

C10CN and Kromasil Eternity columns was 12 and 14 minutes, respectively. The reliability of the linear approximation in both cases was more than 0.99, however, the slopes on the Kromasil Eternity column were 1.35–1.65 times higher than on Diasphere C10CN. The degree of extraction of tetracyclines from deionized water on Diapak P and Diapak PG cartridges was 90–95%, from tap water 61–89%, from purified waste water: 51–87%.

Limitations. *The method is not suitable for water bodies with tetracycline contents less than 2 µg/dm³.*

Conclusion. *An HPLC method has been developed for the determination of minocycline, tetracycline, oxytetracycline, demeclocycline, metacycline, and doxycycline in water with preliminary SPE concentration on Diapak P and Diapak PG cartridges. The lower limit of determination for the sorption of target compounds from 0, 1 dm³ of sample was 2 µg/dm³.*

Keywords: HPLC; SPE; minocycline; tetracycline; oxytetracycline; demeclocycline; metacycline; doxycycline

Compliance with ethical standards. *The study does not require the conclusion of the Biomedical Ethics Committee.*

For citation: Nekrasova L.P., Kuleshova O.Ju. Determination of antibiotics of the tetracycline group in water by high-performance liquid chromatography on a diode matrix detector with preliminary concentration by solid-phase extraction. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal.* 2024; 103(3): 266–272. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2024-103-3-266-272> <https://elibrary.ru/qfzsrq> (In Russ.)

For correspondence: Larisa P. Nekrasova, MD, PhD, DSci., Head of the Hygiene Department, Leading Researcher of the Department of Physical and Chemical Research and Ecotoxicology of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: L.Nekrasova@cspmrz.ru

Contribution: Nekrasova L.P. – the concept and design of the study, writing the text, collecting material and processing data, editing; Kuleshova O.Yu. – collecting material and processing data; All authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

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

Acknowledgment. The study was supported by the state contract “Conducting an analytical review to identify priority chemical pollutants in the wastewater of the metropolis and water bodies polluted by them.”

Received: October 19, 2023 / Revised: February 14, 2024 / Accepted: March 11, 2024 / Published: April 10, 2024

Введение

Антибиотики тетрациклиновой группы широко используются в качестве противомикробных средств, проявляющих активность в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий [1]. Повсеместное применение антибиотиков в медицине, ветеринарии, животноводстве, аквакультуре привело к новой глобальной экологической проблеме – загрязнению окружающей среды фармпрепаратами [2–6]. Присутствие антибиотиков в окружающей среде и продуктах питания вызывает развитие антибиотикорезистентности, что создаёт потенциальную угрозу экосистемам и риски для здоровья человека [7–11].

Допустимые уровни остаточного содержания антибиотиков в Российской Федерации для некоторых групп продуктов питания и продовольственного сырья регламентируются нормативными документами^{1,2,3}, в которых отражены также аттестованные методы определения различных групп антибиотиков. Поэтому в отношении заявленной продукции осуществляется государственный контроль, в то время как вода, ежедневно потребляемая населением, на содержание лекарственных препаратов, в том числе антибиотиков, проверке не проходит⁴. Загрязнение антибиотиками водоёмов наблюдается повсеместно [1–6, 12–15]. Сведений об уровнях загрязнения водоёмов антибиотиками в Российской Федерации чрезвычайно мало. В водохранилищах Московской, Тверской и Смоленской областей в 2016–2019 гг. найдены сульфаметоксазол, триметоприм, офлоксацин и эритромицин [16], в водоёмах Северо-Западного региона в 2009–2010 гг. были обнаружены диклофенак, кетопрофен и ципрофлоксацин [17], в Москве-реке в 2020 г. найдены миноциклин, сульфодофузол и метациклин [18].

¹ Решение Комиссии Таможенного союза от 09.12.2011 г. № 880 (ред. от 10.06.2014 г.) «О принятии технического регламента Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (вместе с ТР ТС 021/2011. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции»).

² Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю).

³ Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28 «О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сыре, и методиках их определения».

⁴ СанПин 1.2.3685–21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания».

Антибиотики находят не только в воде водоёмов, но и в питьевой воде: водопроводной [19–21], бутилированной [19, 20, 22], в воде колодезь [23]. Основной вклад в загрязнение водных объектов вносят стоки предприятий фармацевтической промышленности, больниц, животноводческих комплексов. Очистные сооружения не позволяют в полной мере утилизировать антибиотики, в результате чего последние попадают в водозаборы, а затем и в водопроводную воду [19, 21]. Ежедневное употребление с водой малых доз антибиотиков создаёт риски для здоровья человека [19, 20].

Определение антибиотиков является актуальной научной и практической задачей. В Российской Федерации имеется целый ряд аттестованных методов определения остаточного содержания антибиотиков в продуктах питания, например, ГОСТ 31694–2012⁵ и ГОСТ 34533–2019⁶. Нормативные документы, регламентирующие определение антибиотиков в объектах окружающей среды, и в частности, в воде, отсутствуют. Содержание антибиотиков в поверхностной воде различных объектов колеблется в пределах от нескольких нг/дм³ в водоёмах до сотен мкг/дм³ в сточных водах [1, 5, 7, 12]. Для определения таких концентраций требуются высокочувствительные методы анализа и эффективные приёмы концентрирования. Большинство исследований по определению загрязнений воды различных водных объектов выполнено методами ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС [24, 25]. Данный метод, несмотря на неоспоримые достоинства, является дорогостоящим и доступным узкому кругу лабораторий. Для массового мониторинга целесообразно использовать более экономичные детекторы, позволяющие определять антибиотики в водных объектах с приемлемой чувствительностью. Для решения этой задачи требуются эффективные приёмы выделения и концентрирования. Оптимальным методом концентрирования антибиотиков из водных проб является твердофазная экстракция (ТФЭ) [24]. Для выделения антибиотиков из объектов использовались различные промышленно выпускаемые картриджи [15, 24, 26]. В качестве наиболее часто

⁵ ГОСТ 31694–2012. Продукты пищевые, продовольственное сырьё. Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

⁶ ГОСТ 34533–2019. Продукты пищевые, продовольственное сырьё. Метод определения остаточного содержания сульфаниламидов, нитроимидазолов, пенициллинов, амфениколов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

встречающихся сорбентов для ТФЭ тетрациклинов называют Oasis HLB (Waters) и Strata XL (Phenomenex). Многие работы посвящены применению сверхсшитого полистирола для выделения антибиотиков, в том числе тетрациклинов, из воды и продуктов питания [24, 27, 28]. Не секрет, что научно-исследовательские и аналитические лаборатории в настоящее время испытывают сложности с обеспечением импортными расходными материалами, поэтому в настоящем исследовании было необходимо решить поставленную задачу, используя доступные хроматографические колонки и картриджи для ТФЭ.

Цель работы – разработка метода определения антибиотиков тетрациклиновой группы в воде на диодно-матричном детекторе с предварительным твердофазным концентрированием.

Материалы и методы

Объекты исследования – стандартные растворы тетрациклинов в деионизованной, водопроводной, природной и очищенной сточной воде. *Картриджи для ТФЭ* – ISOLUTE MFC 18 (3 мл, 500 мг – Biotage, Швеция), Supel-Select HLB (1 мл, 30 мг – Merck, Германия) и Диапак П (3 мл, 300 мг), Диапак ПГ (3 мл, 300 мг и 3 мл, 60 мг), Диасорб С16Т (1 мл, 300 мг) – все БиохимМак-СТ (Россия). *Хроматографические колонки*: Диасфер – C10CN 250 × 4,6 мм, 5 мкм (БиохимМак СТ, Россия), Kromasil Classic 250 × 4,6 мм, Kromasil Eternity 250 × 4,6 мм (Nouryon, Швеция). *Реактивы и стандартные образцы*. Тетрациклин (Tetracycline hydrochloride, Sigma-Aldrich, Израиль), окситетрациклин (Oxytetracycline hydrochloride, Sigma-Aldrich, Китай), миноциклин (Minocycline hydrochloride, Sigma-Aldrich, Китай), метациклин (Methacycline hydrochloride vetranal, Sigma-Aldrich, США), демеклоциклин (Demeclocycline hydrochloride, Sigma-Aldrich, Южная Корея), доксициклин (Doxycycline hyclate, Sigma-Aldrich, Китай), Трилон Б (натриевая соль ЭДТА, ч.д.а., Спектрохим, Россия), ацетонитрил (для ВЭЖХ, Компонент-реактив, Россия), метанол (для ВЭЖХ-МС, Merck, Германия), ортофосфорная кислота (х.ч., 87%, Компонент-реактив, Россия), вода деионизованная (сопротивление 18,2 мОм). *Оборудование*. Спектрофотометр двухлучевой UV-1800 (Shimadzu, Япония), манифолд VacMaster-10 (Biotage, Швеция), насос вакуумный N86KTE (Сканлаб, Россия), воздушный насос V-20 (HAILEA, Китай), хроматограф жидкостной Agilent 1100 (Agilent Technology, США), включающий блоки: термостат колонок G1316A, диодноматричный детектор G1315B, насос G1311A, дегазатор G1322A, автосамплер G1313A; устройство для подготовки воды для ВЭЖХ Synergy ICW-3000 (Millipore, Франция), рН-метр Экотест-2000 (НПП Эконикс, Россия).

Проведение ТФЭ. Картриджи для ТФЭ активировали 1–2 мл ацетонитрила, кондиционировали 10 мл воды. Сорбцию целевых соединений из модельных растворов на основе деионизованной, водопроводной, природной и очищенной сточной воды проводили в динамическом режиме со скоростью 3–5 мл в минуту. Картриджи промывали 10–20 мл воды, сушили под вакуумом и элюировали тетрациклины двумя-тремя порциями по 1 мл смеси ацетонитрила с метанолом (1 : 1). Элюент выпаривали досуха в токе воздуха при комнатной температуре. Осадок растворяли в 0,5 мл подвижной фазы. Перед проведением ТФЭ пробы очищенной сточной, природной и водопроводной воды фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, к 100 мл отфильтрованной пробы добавляли стандартные растворы тетрациклинов, 0,25 г трилона Б и оставляли на 1 ч. Затем проводили ТФЭ как описано выше.

Условия хроматографического разделения. Определение тетрациклинов проводили на колонке Диасфер – C10CN (250 × 4,6 мм, 5 мкм) при температуре плюс 30 °С в изократическом режиме. Элюент – смесь ацетонитрила с ортофосфорной кислотой (рН = 3,0) в соотношении 22 : 78, скорость потока – 1 мл/мин, и Kromasil Eternity (250 × 4,6 мм, 5 мкм)

при температуре плюс 30 °С, режим изократический, скорость потока 0,6 мл/мин, элюент – смесь ацетонитрила с ортофосфорной кислотой (рН = 3,0) в соотношении 20 : 80. Объем пробы в обоих случаях был равен 20 мкм. Длина волны – 350 нм. Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Excel, доверительный интервал средних значений рассчитывали с использованием критерия Стьюдента для вероятности 95%.

Результаты

Разработка твердофазного выделения и хроматографического разделения проводилась на модельных растворах, приготовленных путём добавления растворов антибиотиков заданной концентрации в пробы природной, водопроводной или сточной воды, прошедшей все этапы очистки на очистных сооружениях перед их сбросом в водоёмы. Все исходные пробы, использованные в процессе разработки оптимальных условий ТФЭ и ВЭЖХ, были проанализированы на содержание антибиотиков в соответствии с процедурой, описанной в разделе «Материалы и методы». В пробах водопроводной и природной воды антибиотики не были обнаружены, в пробе очищенной сточной воды были найдены миноциклин, тетрациклин и метациклин.

Выбор сорбента для ТФЭ. Оптимальным способом выделения и концентрирования антибиотиков тетрациклиновой группы из воды является ТФЭ на обращённо-фазовых сорбентах. При этом выбор подходящего сорбента представляет собой отдельную аналитическую задачу. Предварительный анализ сорбентов на полноту извлечения тетрациклинов из образцов воды осуществляли спектрофотометрически, контролируя каждый этап ТФЭ: сорбцию, промывку, элюирование. В качестве экспериментальных образцов были использованы промышленно выпускаемые картриджи Диапак С16Т (монофункциональный гексадецил – гидрофобный сорбент с привитыми гексадецильными группами для ТФЭ органических соединений), Диапак П (сверхсшитый полистирол, сополимер стирола и дивинилбензола – гидрофобный сорбент с максимальной площадью поверхности для извлечения широкого спектра органических соединений), Диапак ПГ (сополимер дивинилбензола и гидрофильного мономера), Super Select HLB (полистирол с гидрофильными группами, имеющий сбалансированные гидрофильные и гидрофобные свойства), Isolute MFC18 (неполярный монофункциональный октадецил).

На всех изученных сорбентах, кроме Super Select HLB, тетрациклины сорбируются полностью, однако количественно их элюировать удается только с картриджем Диапак ПГ и Диапак П.

Определение антибиотиков методом ВЭЖХ. Для разделения тетрациклинов были опробованы хроматографические колонки Диасфер – C10CN, Kromasil Classic и Kromasil Eternity, все размером 250 × 4,6 мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила с водным раствором фосфорной кислоты (рН в пределах 2,75–3,2). Скорость потока составляла от 0,4 до 1 мл в минуту. Содержание ацетонитрила менялось от 30 до 18%. На колонке Kromasil Classic не удалось получить удовлетворительных результатов – пики были размытыми и несимметричными при любых условиях разделения. Параметры хроматографического разделения очень чувствительны к содержанию органического растворителя в элюенте. Увеличение доли ацетонитрила в подвижной фазе приводит не только к сокращению времени анализа, но и к ухудшению разделения хроматографических пиков антибиотиков. На колонке Диасфер – C10CN не удалось добиться разделения критической пары «метациклин – доксициклин» более 0,7. Уменьшение скорости потока лишь существенно увеличивало время анализа, но не улучшало разделения метациклина и доксициклина. Для колонки Kromasil Eternity были подобраны оптимальные условия разделения путём изменения как доли ацетонитрила в подвижной фазе, так и регулированием

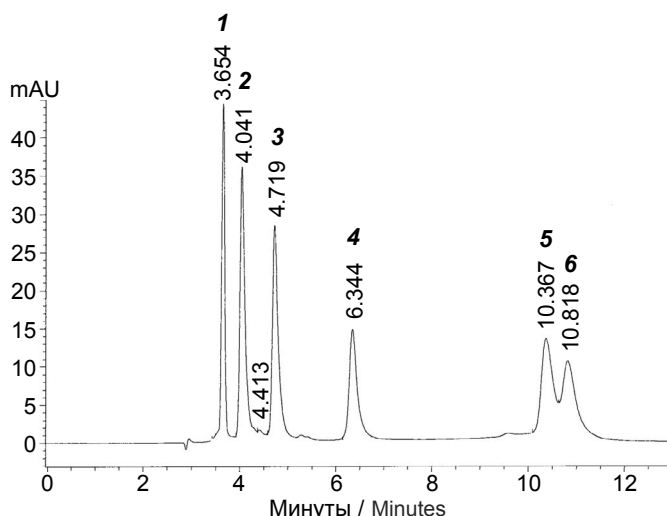


Рис. 1. Хроматограмма раствора, содержащего миноциклин 7,8 мг/дм³ (1), окситетрациклин 9,5 мг/дм³ (2), тетрациклин 8,3 мг/дм³ (3), демеклоциклин 9,5 мг/дм³ (4), метациклин 10,3 мг/дм³ (5), доксициклин 12,2 мг/дм³ (6). Колонка Диасфер-С10СН 250 × 4,6 мм 5 мкм, скорость потока 1 мл/мин, подвижная фаза – ацетонитрил: фосфорная кислота (рН = 3,0) 22 : 78; 30 °С.

Fig. 1. Chromatogram of a solution containing minocycline 7.8 mg/dm³ (1), oxytetracycline 9.5 mg/dm³ (2), tetracycline 8.3 mg/dm³ (3), demeclocycline 9.5 mg/dm³ (4), metacycline 10.3 mg/dm³ (5), doxycycline 12.2 mg/dm³ (6). Column Diasfer-C10CN 250 × 4.6 mm 5 μm, flow rate 1 ml/min, mobile phase – acetonitrile: phosphoric acid (pH = 3.0) 22 : 78; 30 °C.

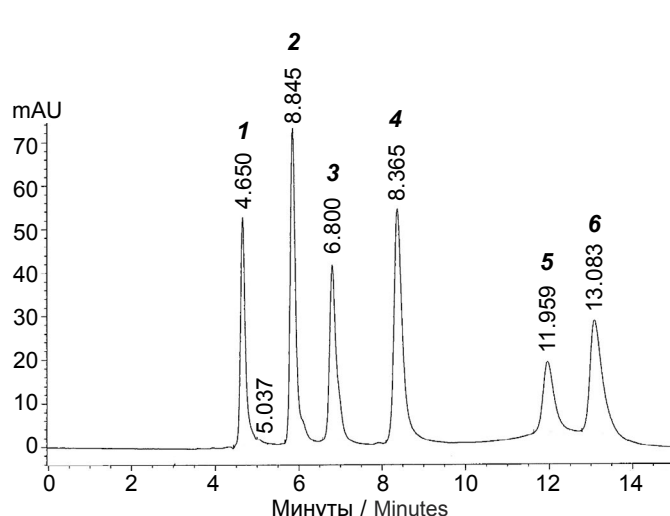


Рис. 2. Хроматограмма раствора, содержащего миноциклин 9,7 мг/дм³ (1), окситетрациклин 14,4 мг/дм³ (2), тетрациклин 8,9 мг/дм³ (3), демеклоциклин 22,4 мг/дм³ (4), метациклин 8,6 мг/дм³ (5), доксициклин 25,4 мг/дм³ (6). Колонка Kromasil Eternity 250 × 4,6 мм 5 мкм, скорость потока 0,6 мл/мин, подвижная фаза – ацетонитрил: фосфорная кислота (рН = 3,0) 20 : 80; 30 °С.

Fig. 2. Chromatogram of a solution containing minocycline 9.7 mg/dm³ (1), oxytetracycline 14.4 mg/dm³ (2), tetracycline 8.9 mg/dm³ (3), demeclocycline 22.4 mg/dm³ (4), metacycline 8.6 mg/dm³ (5), doxycycline 25.4 mg/dm³ (6). Column Kromasil Eternity 250 × 4.6 mm 5 μm, flow rate 0.6 ml/min, mobile phase – acetonitrile: phosphoric acid (pH = 3.0) 20 : 80; 30 °C.

скорости потока. Оба параметра влияли на параметры разделения, причём уменьшение скорости потока увеличивало чувствительность определения. Порядок выхода соединений был одинаковым на двух колонках: миноциклин, окситетрациклин, тетрациклин, демеклоциклин, метациклин, доксициклин (рис. 1, 2), однако параметры разделения были разными (табл. 1). Достичь коэффициента разделения $R \geq 1$ метациклина и доксициклина на колонке Диасфер – С10СН не удалось, однако параметры калибровочных графиков

в интервале концентраций являются приемлемыми для проведения количественного анализа. При этом коэффициенты наклона калибровочных графиков индивидуальных соединений в 1,35–1,65 раза больше на колонке Kromasil Eternity (табл. 2).

Кроме параметров разделения антибиотиков друг от друга, важным критерием ВЭЖХ является разделение хроматографических пиков миноциклина (первого из элюируемых соединений) и матрицы, преимущественно гуминовых и

Таблица 1 / Table 1

Коэффициенты разделения пиков на хроматографических колонках Диасфер – С10СН и Kromasil Eternity при оптимальных условиях разделения

Peak separation coefficients on chromatographic columns Diasfer – C10CN and Kromasil Eternity under optimal separation conditions

Разделение Separation R^*	Диасфер – С10СН Diasfer – C10CN	Kromasil Eternity
	Миноциклин/окситетрациклин Minocycline/oxytetracycline	1.37
Окситетрациклин/тетрациклин Oxytetracycline/tetracycline	1.48	1.35
Тетрациклин/демеклоциклин Tetracycline/demeclocycline	3.12	2.43
Демеклоциклин/метациклин Demeclocycline/methacycline	7.22	4.52
Метациклин/доксициклин Metacycline/doxycycline	0.69	1.32

Примечание. * $R = 2(t_{R1} - t_{R2}) / (w_1 + w_2)$, где t_{R1} и t_{R2} – времена выхода компонентов (мин); w_1 и w_2 – ширина их пиков на уровне нулевой линии (мин).

Note: * $R = 2(t_{R1} - t_{R2}) / (w_1 + w_2)$, where t_{R1} and t_{R2} – component release times (min); w_1 and w_2 – width of their peaks at the level of the zero line (min).

Таблица 2 / Table 2

Уравнения градуировочных зависимостей площади пика S (Y) от концентрации С, мг/дм³ (X), полученных в оптимальных условиях на разных хроматографических колонках для антибиотиков тетрациклиновой группы

Equations of calibration dependences of peak area S (Y) on concentration C, mg/dm³ (X), obtained under optimal conditions on different chromatographic columns for antibiotics of the tetracycline group

Соединение Compound	Диасфер – С10СН Diasfer – C10CN		Kromasil Eternity	
	$Y = aX$	r^2	$Y = aX$	r^2
Миноциклин Minocycline	$Y = 26.493x$	0.9983	$Y = 41.964x$	0.9993
Окситетрациклин Oxytetracycline	$Y = 28.018x$	0.9984	$Y = 41.347x$	0.9999
Тетрациклин Tetracycline	$Y = 29.67x$	0.9979	$Y = 45.937x$	0.9996
Демеклоциклин Demeclocycline	$Y = 17.912x$	0.9994	$Y = 29.751x$	0.9993
Метациклин Methacycline	$Y = 20.695x$	0.9996	$Y = 34.218x$	0.9986
Доксициклин Doxycycline	$Y = 15.926x$	0.9988	$Y = 21.337x$	0.9983

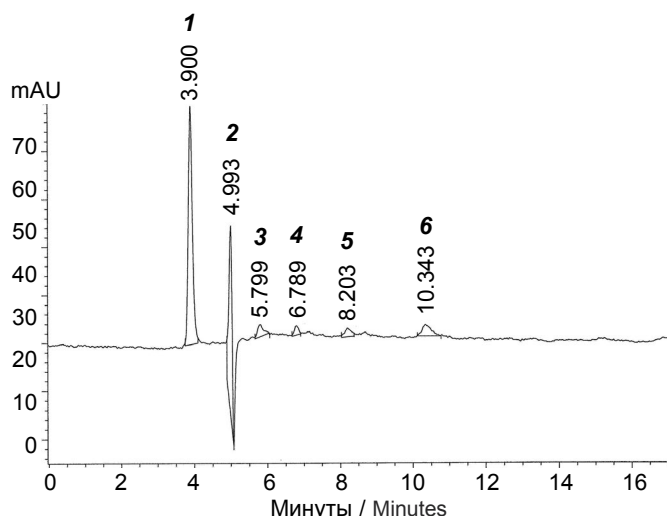


Рис. 3. Хроматограмма речной воды, содержащей следовые количества миноциклина (3), окситетрациклина (4), тетрациклина (5) и демеклоциклина (6). Пики 1 и 2 принадлежат растворённому органическому веществу, извлечённому из воды в процессе ТФЭ. Колонка Kromasil Eternity 250 × 4,6 мм 5 мкм, скорость потока 0,5 мл/мин, подвижная фаза – ацетонитрил: фосфорная кислота (рН = 3,0) 20 : 80; 30 °С.

Fig. 3. Chromatogram of river water containing trace amounts of minocycline (3), oxytetracycline (4), tetracycline (5) and demeclocycline (6). Peaks 1 and 2 belong to dissolved organic matter extracted from water during the SPE process. Column Kromasil Eternity 250 × 4.6 mm 5 μm, flow rate 0.5 ml/min, mobile phase – acetonitrile: phosphoric acid (pH = 3.0) 20 : 80; 30 °C.

фульвовых кислот, которые частично извлекаются вместе с тетрациклинами. Для апробации условий хроматографического разделения в работе были использованы воды различного происхождения (водопроводная, поверхностная и подземная природная вода). Во всех случаях хроматографический пик (или пики) матрицы характеризовались самыми короткими временами удерживания и элюировались первыми (рис. 3). Поскольку состав растворённого органического вещества в различных водных объектах разный, то и времена удерживания соединений матрицы отличались друг от друга. В отдельных случаях наблюдалось ухудшение разделения пиков матрицы и миноциклина, которое корректировали путём незначительного уменьшения доли ацетонитрила в подвижной фазе.

Полнота извлечения индивидуальных антибиотиков на картриджах Диапак ПГ. Для определения степени извлечения антибиотика при ТФЭ поступали следующим образом. К пробе воды добавляли 0,5 см³ стандартного раствора тетрациклинов заданной концентрации, добавляли 0,25 г трилона Б, доводили объём до 100 см³ и через 1 ч проводили ТФЭ. Значения рН образцов составляли 4,8–5,8. Степень извлечения миноциклина, тетрациклина, окситетрациклина, демеклоциклина, метациклина и доксициклина рассчитывали по формуле:

$$E = S_1 / S_0 \cdot 100\%,$$

где S_0 – площадь пика раствора антибиотика без ТФЭ (добавляемого стандартного раствора); S_1 – площадь пика раствора антибиотика после ТФЭ.

Полученные результаты представлены в табл. 3.

Для определения предела обнаружения LOD и определения LOQ используются разные подходы, и данный вопрос остаётся дискуссионным [29]. С учётом оснащённости лаборатории и используемой аналитической практики удобным является понятие PQL.

Таблица 3 / Table 3

Извлечение тетрациклинов из водных образцов в присутствии ЭДТА на картриджах Диапак ПГ (n = 3), масса сорбента 300 мг
Extraction of tetracyclines from aqueous samples in the presence of EDTA on Diapak PG cartridges (n = 3). Sorbent weight 300 mg

Соединение Compound	Степень извлечения тетрациклинов из воды, % Degree of extraction of tetracyclines from water, %		
	Деионизованная Deionized water	Водопроводная Tap water	Очищенная сточная Treated wastewater
Миноциклин Minocycline	90.2 ± 7.5	61.5 ± 8.1	50.8 ± 7.3
Окситетрациклин Oxytetracycline	93.1 ± 5.1	88.8 ± 6.1	75.7 ± 5.9
Тетрациклин Tetracycline	91.6 ± 6.9	73.9 ± 7.2	87.0 ± 7.8
Демеклоциклин Demeclocycline	89.9 ± 6.3	85.3 ± 5.9	77.3 ± 6.7
Метациклин Methacycline	92.5 ± 8.7	71.8 ± 6.8	74.4 ± 7.2
Доксициклин Doxycycline	94.3 ± 7.9	86.5 ± 8.2	71.9 ± 8.5

Предел практического количественного определения PQL для каждого соединения оценивали, руководствуясь следующими соображениями. Надёжно регистрируемым пиком считали такой пик, площадь которого

$$S_{\min} \geq 6 \text{ (СКО } 5 - 10\%)$$

$$PQL = 100 \cdot S_{\min} \cdot V_2 / a \cdot V_1 \cdot E,$$

где S_{\min} – площадь пика; a – угловой коэффициент калибровочного графика $Y = aX$ (см. табл. 2); V_1 – объём пробы воды, использованный для ТФЭ; V_2 – объём подвижной фазы, в котором растворяют выделенные соединения для хроматографирования; E – степень извлечения соединения при ТФЭ (см. табл. 3).

Используя наименьшие значения степеней извлечения, получим следующие значения PQL на колонке Kromasil Eternity (250 × 4,6 мм, 5 мкм): миноциклин – 1,4 мкг/дм³; окситетрациклин – 1 мкг/дм³; тетрациклин – 0,9 мкг/дм³; демеклоциклин – 1,4 мкг/дм³; метациклин – 1,2 мкг/дм³; доксициклин – 2 мкг/дм³.

Обсуждение

В работах, посвященных определению антибиотиков в воде, как правило, использовали картриджи Oasis HLB и Strata XL. Oasis HLB фирмы Waters – универсальный полимерный обращённо-фазовый сорбент, предназначенный для извлечения широкого спектра кислотных, основных и нейтральных соединений из различных матриц с использованием простого универсального протокола, – чрезвычайно популярен и используется во многих методиках Американского агентства по охране окружающей среды, в том числе и в EPA Method 1694 [30], однако в настоящее время он труднодоступен. В настоящей работе продемонстрированы отличные возможности отечественных картриджей, в первую очередь Диапак ПГ. Достоинства Диапак П были описаны ранее [23, 27].

Важным компонентом количественного извлечения тетрациклинов при ТФЭ является ЭДТА, которую добавляли в пробу воды для связывания присутствующих в водопроводной и природной воде ионов металлов. Известно, что тетрациклины склонны к комплексообразованию с ионами двухвалентных металлов [31]. Поскольку константы устой-

чивости комплексов металлов с ЭДТА на 8–10 порядков превосходят таковые для комплексов с тетрациклином, становится возможным в присутствии ЭДТА высвободить тетрациклины в свободном виде для количественного извлечения их из натуральных проб при ТФЭ. Отечественная хроматографическая колонка Диасфер – С10СN была выбрана во многом благодаря высокой устойчивости к кислотам, поскольку разделение тетрациклинов осуществляется при низких значениях pH. Однако лучшие параметры хроматографического разделения были получены на колонке Kromasil Eternity. В данной работе для извлечения тетрациклинов был использован объем пробы, равный 100 см³. Для увеличения чувствительности анализа объем пробы может быть увеличен.

Ограничения исследования. Метод непригоден для водных объектов с содержанием тетрациклинов менее 2 мкг/дм³.

Заключение

Разработана методика определения миноциклина, окситетрациклина, тетрациклина, демеклоциклина, метациклина и доксициклина в воде с предварительным твердофазным концентрированием на картриджах Диапак ПГ. Степень извлечения из деионизированной воды составляла 90–95%, а из водопроводной – 61–89%. Достигнуты хорошие параметры хроматографического разделения. Предел определения при экстракции тетрациклинов из 100 см³ пробы составлял не более 2 мкг/дм³.

Литература

(п.п. 2–5, 9, 10, 12–15, 19–21, 24, 30, 31 см. References)

1. Тимофеева С.С., Гудилова О.С. Антибиотики в окружающей среде: состояние и проблемы. XXI век. *Техносферная безопасность*. 2021; 6(3): 251–65. <https://doi.org/10.21285/2500-1582-2021-3-251-265> <https://elibrary.ru/diorqu>
6. Прожерина Ю. Фармацевтические отходы как новая экологическая проблема. *Ремедиум*. 2017; (11): 14–9. <https://doi.org/10.21518/1561-5936-2017-11-14-19> <https://elibrary.ru/zwhrqh>
7. Терехова В.А., Руднева И.И., Поромов А.А., Парамонова А.И., Кыдралиева К.А. Распространение и биологические эффекты антибиотиков в водных экосистемах. *Вода: Химия и экология*. 2019; (3–6): 92–112. <https://elibrary.ru/cimply>
8. Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире. *Педиатрическая фармакология*. 2017; 14(5): 341–54. <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782> <https://elibrary.ru/ztielt>
11. Антропова Н.С., Ушакова О.В., Водянова М.А., Савостикова О.Н. Риск распространения антибиотикорезистентности через объекты окружающей среды и продукты питания. *Российский журнал восстановительной медицины*. 2020; (4): 36–51. <https://elibrary.ru/eqyxxj>
16. Козлова М.А., Гальвидис И.А., Буркин М.А. Особенности лекарственного загрязнения водных объектов – источников питьевого водоснабжения Москвы (на примере некоторых антибиотиков). *Метеорология и гидрология*. 2020; (8): 87–91. <https://elibrary.ru/iqjwtd>
17. Некрасова Л., Русских Я., Чернова Е., Жаковская З., Никифоров В. Одновременное определение лекарственных соединений методом жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии высокого разрешения. *Аналитика*. 2012; (2): 38–44. <https://elibrary.ru/piespt>
18. Савостикова О.Н., Некрасова Л.П., Алексеева А.В., Мамонов Р.А. Изучение химического состава сточных вод мегаполиса. В кн.: *Сыснинские чтения – 2020. Материалы I Национального конгресса с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды*. М.; 2020: 304–6. <https://elibrary.ru/binivj>
22. Краснова Т.А., Амелин В.Г. Идентификация и определение антибиотиков в питьевой воде методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. *Вода: химия и экология*. 2013; (11): 81–7. <https://elibrary.ru/grpquz>
23. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В. Методы выделения, концентрирования и определения антибиотиков тетрациклиновой группы. *Журнал аналитической химии*. 2015; 70(6): 577–93. <https://doi.org/10.7868/S0044450215060195> <https://elibrary.ru/tpowwr>
25. Лаврухина О.И., Амелин В.Г., Киш Л.К., Третьяков А.В., Пеньков Т.Д. Определение остаточных количеств антибиотиков в объектах окружающей среды и пищевых продуктах. *Журнал аналитической химии*. 2022; 77(11): 969–1015. <https://doi.org/10.31857/S004445022211007X> <https://elibrary.ru/ehjxdo>
27. Удалова А.Ю., Дмитриенко С.Г., Натчук С.В., Апяри В.В., Золотов Ю.А. Концентрирование антибиотиков тетрациклиновой группы на сверхсшитом полистироле и их определение в водах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Журнал аналитической химии*. 2015; 70(3): 273–8. <https://doi.org/10.7868/S0044450215030226> <https://elibrary.ru/tjffjn>
28. Мелехин А.О., Толмачева В.В., Шубина Е.Г., Дмитриенко С.Г., Апяри В.В., Грудев А.И. Применение сверхсшитого полистирола для многокомпонентной твердофазной экстракции остатков 63 ветеринарных препаратов при их определении в курином мясе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии. *Журнал аналитической химии*. 2021; 76(8): 708–22. <https://doi.org/10.31857/S0044450221060049> <https://elibrary.ru/pxmnmc>
29. Экспериянова Л.П., Беликов К.Н., Химченко С.В., Бланк Т.А. Еще раз о пределах обнаружения и определения. *Журнал аналитической химии*. 2010; 65(3): 229–34. <https://elibrary.ru/kkilqd>

References

1. Timofeeva S.S., Gudilova O.S. Antibiotics in the environment: status and problems. *Tekhnosfernaya bezopasnost'*. 2021; 6(3): 251–65. <https://doi.org/10.21285/2500-1582-2021-3-251-265> <https://elibrary.ru/diorqu> (in Russian)
2. Felisa E., Kalka J., Sochackia A., Kowalskaa K., Bajkacz S., Harnisz M., et al. Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment – occurrence and environmental implications. *Eur. J. Pharmacol.* 2020; 866: 172813. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172813>
3. Du L., Liu W. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2012; (32): 309–27. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0062-9>
4. Mojica E.R.E., Aga D.S. Antibiotics pollution in soil and water: Potential ecological and human health issues. In: Nriagu J.O., ed. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier; 2011: 97–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00338-X>
5. Rodriguez-Mozaza S., Vaz-Moreirac I., Della Giustina S.V., Llorcaa M., Barceloa D., Schuberte S., et al. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ. Int.* 2020; 140: 105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
6. Prozherina Yu. Pharmaceutical waste as a new environmental issue. *Remedium*. 2017; (11): 14–9. <https://doi.org/10.21518/1561-5936-2017-11-14-19> <https://elibrary.ru/zwhrqh> (in Russian)
7. Terekhova V.A., Rudneva I.I., Poromov A.A., Paramonova A.I., Kydraliev K.A. Distribution and biological effects of antibiotics in water ecosystems (review). *Voda: Khimiya i ekologiya*. 2019; (3–6): 92–112. <https://elibrary.ru/cimply> (in Russian)
8. Namazova-Baranova L.S., Baranov A.A. Antibiotic resistance in modern world. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2017; 14(5): 341–54. <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782> <https://elibrary.ru/ztielt> (in Russian)
9. Khmelevtsova L.E., Sazykin I.S., Azhogina T.A., Sazykina M.A. The dissemination of antibiotic resistance in various environmental objects (Russia). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020; 27(35): 43569–81. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10231-2>
10. Duarte A.C., Rodrigues S., Afonso A., Nogueira A., Coutinho P. Antibiotic resistance in the drinking water: old and new strategies to remove antibiotics, resistant bacteria, and resistance genes. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; 15(4): 393. <https://doi.org/10.3390/ph15040393>
11. Antropova N.S., Ushakova O.V., Vodyanova M.A., Savostikova O.N. Risk of antibiotic resistance extension via environmental objects and food products (review). *Rossiyskiy zhurnal vosstanovitel'noy meditsiny*. 2020; (4): 36–51. <https://elibrary.ru/eqyxxj> (in Russian)
12. Wang J., Ye K.X., Tian Y., Liu K., Liang L.L., Li Q.Q., et al. Simultaneous determination of 22 antibiotics in environmental water samples by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Se Pu*. 2023; 41(3): 241–9. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1123.2022.06004> (in Chinese)
13. Ferrer I., Zweigenbaum J.A., Thurman E.M. Analysis of 70 Environmental Protection Agency priority pharmaceuticals in water by EPA Method 1694. *J. Chromatogr. A*. 2010; 1217(36): 5674–86. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.002>
14. Kim C., Ryu H.D., Chung E.G., Kim Y., Rhew D.H. Determination of veterinary antibiotic residues: IV. Comparable analytical methods with EPA methods 1694. *J. Korean Soc. Water Environ.* 2016; 32(6): 670–99. <https://doi.org/10.15681/KSWE.2016.32.6.670>
15. Pailier J.Y., Krein A., Pfister L., Hoffmann L., Guignard C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface

- water and wastewater in Luxembourg. *Sci. Total. Environ.* 2009; 407(16): 4736–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.042>
16. Kozlova M.A., Gal'vidis I.A., Burkin M.A. Features of pharmaceutical pollution of water bodies-sources of drinking water supply in Moscow (a case study for some antibiotics). *Meteorologiya i gidrologiya.* 2020; (8): 87–91. <https://elibrary.ru/ijqwtid> (in Russian)
 17. Nekrasova L., Russkikh Ya., Chernova E., Zhakovskaya Z., Nikiforov V. Simultaneous determination some pharmaceuticals using liquid chromatography-high resolution mass spectrometer LTQ orbitrap. *Analitika.* 2012; (2): 38–44. <https://elibrary.ru/piespt> (in Russian)
 18. Savostikova O.N., Nekrasova L.P., Alekseeva A.V., Mamonov R.A. Study of the chemical composition of metropolis wastewater. In: *Sytin Readings – 2020. Proceedings of the First National Congress with International participation on Human Ecology, Hygiene and Environmental Medicine [Systinskie chteniya – 2020. Materialy I Natsional'nogo kongressa s mezhdunarodnym uchastiem po ekologii cheloveka, gigiene i meditsine okruzhayushchey sredy].* Moscow; 2020: 304–6. <https://elibrary.ru/binivj> (in Russian)
 19. Lyu J., Chen Y., Zhang L. Antibiotics in drinking water and health risks – China, 2017. *China CDC Wkly.* 2020; 2(23): 413–7. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.106>
 20. Wang H., Wang N., Wang B., Zhao Q., Fang H., Fu C., et al. Antibiotics in drinking water in Shanghai and their contribution to antibiotic exposure of school children. *Environ. Sci. Technol.* 2016; 50(5): 2692–9. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05749>
 21. Ansam R. Mahmood, Halah H. Al-Haideri and Fikrat M. Hassan. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. *Advances in Public Health* Volume 2019, Article ID 7851354, 10 pages <https://doi.org/10.1155/2019/7851354>
 22. Krasnova T.A., Amelin V.G. Identification and detection of antibiotics in drinking water using mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization. *Voda: khimiya i ekologiya.* 2013; (11): 81–7. <https://elibrary.ru/rpqguz> (in Russian)
 23. Udalova A.Yu., Dmitrienko S.G., Apyari V.V. Methods for the separation, preconcentration, and determination of tetracycline antibiotics. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2015; 70(6): 577–93. <https://doi.org/10.1134/S1061934815060180> <https://elibrary.ru/ugblvf> (in Russian)
 24. Gray A.D., Todd D., Hershey A.E.. The seasonal distribution and concentration of antibiotics in rural streams and drinking wells in the piedmont of North Carolina. *Science of the Total Environment.* 2020. 710, 136286. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136286>
 25. Lavruchina O.I., Amelin V.G., Kish L.K., Tret'yakov A.V., Pen'kov T.D. Determination of residual amounts of antibiotics in environmental objects and food products. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2022; 77(11): 969–1015. <https://doi.org/10.31857/S004445022211007X> <https://elibrary.ru/ehjxdo> (in Russian)
 26. Mutavdžić Pavlović D., Babić S., Dolar D., Asperger D., Kosutić K., Horvat A.J., et al. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC-diode array detection. *J. Sep. Sci.* 2010; 33(2): 258–67. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900571>
 27. Udalova A.Yu., Dmitrienko S.G., Natchuk S.V., Apyari V.V., Zolotov Yu.A. Preconcentration of tetracycline antibiotics on a hyper-crosslinked polystyrene and their determination in waters by high-performance liquid chromatography. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2015; 70(3): 273–8. <https://doi.org/10.1134/S1061934815030211> <https://elibrary.ru/ufnabp>
 28. Melekhin A.O., Tolmacheva V.V., Shubina E.G., Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Grudev A.I. Using hypercrosslinked polystyrene for the multicomponent solid-phase extraction of residues of 63 veterinary preparations in their determination in chicken meat by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2021; 76(8): 946–59. <https://doi.org/10.1134/S1061934821060046> <https://elibrary.ru/grljlh>
 29. Eksperiandova L.P., Belikov K.N., Khimchenko S.V., Blank T.A. Once Again about Determination and Detection Limits. *Zhurnal analiticheskoy khimii.* 2010; 65 (3): 229–34. <https://elibrary.ru/kkilqd>
 30. EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water; 2007. Available at: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf
 31. Pulicharla R., Hegde K., Brar S.K., Surampalli R.Y. Tetracyclines metal complexation: Significance and fate of mutual existence in the environment. *Environ. Pollut.* 2017; 221: 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.017>

Информация об авторах:

Некрасова Лариса Петровна – канд. хим. наук, вед. науч. сотр. отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: LNekrasova@cspmpz.ru

Кулешова Оксана Юрьевна – вед. специалист отд. физико-химических исследований и экотоксикологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: OKuleshova@cspmpz.ru

Information about the authors:

Larisa P. Nekrasova, MD, PhD, Head of the Hygiene Department, of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-1269-3161> E-mail: LNekrasova@cspmpz.ru

Oksana Ju. Kuleshova, MD, PhD, DSci., Leading Researcher of the Department of Physical and Chemical Research and Ecotoxicology of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: OKuleshova@cspmpz.ru