

**Жидкостная хроматография /
Масс-спектрометрия**

Авторы:
Mass Spectrometry Team
PerkinElmer Inc.
Shanghai, China

Определение сульфаниламидов в меде методом ВЭЖХ-МС/МС

Введение

Антибиотики (противомикробные препараты) широко используются для профилактики и лечения заболеваний в животноводстве. Широкое использование антибиотиков в животноводстве может приводить к их переносу в готовые продукты питания, представляя опасность для здоровья человека. Остаточное содержание противомикробных препаратов в пище может делать ее токсичной, вызывать побочные эффекты и приводить к развитию лекарственно-устойчивых бактерий. Сульфаниламиды – наиболее часто используемая группа антибиотиков в пчеловодстве для лечения гнильца (гнилец или гнилобой – инфекционное бактериальное заболевание личинок пчел, вызывающее их гниение). Неправильное или чрезмерное использование сульфаниламидов может привести к их попаданию в мед, в связи с этим разработка быстрого и эффективного метода количественного определения антибиотиков данной группы в мёде является важной задачей.

Экспериментальная часть

Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ PerkinElmer с масс-спектрометрическим детектором QSi^h 210 (масс-анализатор - тройной квадруполь).

Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3QTM (PerkinElmer).

Пробоподготовка

1. 5.0 грамм меда взвешивали в химическом стакане объемом 150 мл, добавляли 25 мл раствора фосфорной кислоты (рН = 2.0), после чего, содержимое стакана встряхивали/перемешивали до полного растворения образца.

2. Процедура очистки образца состоит из двух последовательных стадий с применением твердофазной экстракции (ТФЭ).

Стадия 1.

Раствор образца пропускали через предварительно подготовленный катионообменный картридж (ароматические сульфоновые кислоты) со скоростью 2 мл/мин, затем последовательно промывали

картридж 5 мл раствора фосфорной кислоты (рН = 2) и 5 мл воды. Для элюирования определяемых веществ из картриджа использовали 40 мл фосфатного буфера (0.2 моль/л, рН = 8). К элюенту добавляли 1.5 мл раствора гептансульфоната натрия и доводили рН раствора до 6 фосфорной кислотой.

Стадия 2.

Полученный раствор (стадия 1) со скоростью 2 мл/мин пропускали через предварительно подготовленный HLB картридж (сбалансированный гидрофильно-липофильный обращеннофазный собент), затем промывали картридж 3 мл воды сушили его под вакуумом. Для элюирования определяемых веществ из картриджа использовали 10 мл метанола. Метанол упаривали досуха и растворяли остаток в 1 мл подвижной фазы А.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометрического детектора представлены в таблице 1, 2 и 3 соответственно.

Таблица 1. Хроматографические условия.

Хроматографическая колонка: PerkinElmer Brownlee™ SPP C18, 100 мм×2.1 мм, 2.7 мкм						
Подвижная фаза А (ПФ А): 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде						
Подвижная фаза В (ПФ В): ацетонитрил						
ШАГ	Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	ПФ А (%)	ПФ В (%)	Кривая градиента	
1	0	0.4	90	10		
2	1.00	0.4	90	10	6	
3	4.00	0.4	70	30	6	
4	5.00	0.4	70	30	6	
5	6.00	0.4	10	90	6	
6	6.50	0.4	10	90	6	
7	7.00	0.4	90	10	6	
8	9.00	0.4	90	10	6	
Температура термостата: 40 °С						
Вводимый объем: 3 мкл						

Таблица 2. Параметры источника ионизации, времена удерживания t_R и параметры MRM переходов определяемых соединений.

Режим ионизации	ESI +
Напряжение ESI +	4500 В
Температура источника	500 °С
Температура HSID интерфейса	320 °С
Осушающий газ	200 °С
Распыляющий газ	175 единиц

Таблица 2. (продолжение)

Компонент	t_R мин	Родительский ион/ Дочерний ион 1	EV ¹	CE ²	Родительский ион/ Дочерний ион 2	EV	CE
Сульфадиазин	1.34	251.2/156.1	28	-21	251.2/92.2	22	-40
Сульфатиазол	1.63	256.1/156.1	26	-20	256.1/108.1	25	-40
Сульфапиридин	1.77	250.2/156.1	24	-24	250.2/184.1	28	-24
Сульфизоксазол	2.65	268.1/156.1	27	-21	268.1/113.2	26	-29
Сульфаметизол	2.86	271.1/156.1	19	-20	271.1/108.0	25	-38
Сульфаметазин	3.02	279.2/186.1	18	-24	279.2/156.1	18	-25
Сульфахлорпидазин	3.66	285.1/156.1	23	-23	285.1/108.1	21	-37
Сульфаметоксазол	3.79	254.2/156.1	29	-23	254.2/108.1	28	-36
Сульфамонетоксин	4.15	281.0/155.8	19	-24	281.0/108.0	30	-38
Сульфадиметоксин	5.11	311.3/156.1	35	-27	311.3/218.1	24	-26
Сульфахиноксалин	5.18	301.1/156.1	22	-23	301.1/108.0	18	-40

¹ – EV (B) – (Entrance Voltage) – входное напряжение на интерфейсе переноса ионов в масс-анализатор.

² – CE (Collision energy) – энергия соударений.

Обсуждение результатов

На рисунке 1 показана хроматограмма полного ионного тока (TIC) одиннадцати сульфаниламидов в режиме MRM переходов.

7/26/2016: std1.pptb0001_162131
TIC + MRM (22 pairs) Exp 1

Number of Scans: 363
Max: 5.78E+4 cps

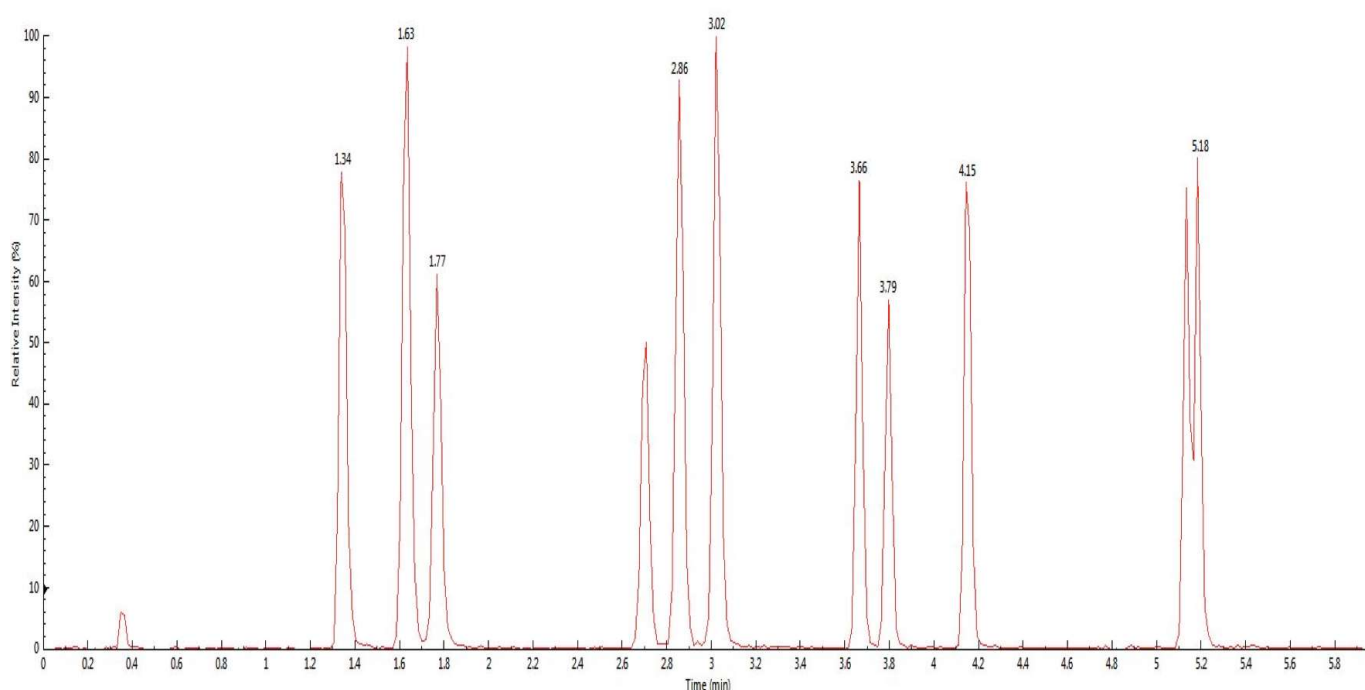


Рисунок 1. Хроматограмма полного ионного тока (TIC) одиннадцати сульфаниламидов.

Значения сигнал/шум (S/N), полученные при концентрации сульфаниламидов равной 0.02 нг/мл и их степень извлечения для процесса пробоподготовки, суммированы в таблице 3.

Количественное определение сульфаниламидов проводили с использованием калибровочных кривых, построенных с использованием стандартных растворов определяемых компонентов в диапазоне концентраций 0.1-10 нг/мл. Калибровочные кривые демонстрируют хорошую линейность - квадрат

коэффициента линейной корреляции $R^2 \geq 0.99$ для всех компонентов. Установленный предел количественного определения (ПКО) для всех сульфаниламидов был равен 0.01 нг/мл. Значения СКО (%) количественного определения концентрации ПКО для всех сульфаниламидов были менее 8%, что демонстрирует хорошую прецизионность метода.

Таблица 3. Сигнал/шум (S/N) и их степень извлечения (СИ) при концентрациях сульфаниламидов 0.02 нг/мл и 0.02 мкг/кг соответственно.

Компонент	S/N 0.02 нг/мл	СИ (%) 0.02 мкг/кг
Сульфадиазин	18	81.6
Сульфатиазол	40	85.9
Сульфапиридин	30	83.2
Сульфизоксазол	50	86.2
Сульфаметизол	100	90.1
Сульфаметазин	400	91.5
Сульфахлорпидазин	30	79.8
Сульфаметоксазол	30	81.1
Сульфамонотоксин	20	77.5
Сульфадиметоксин	25	78.0
Сульфахиноксалин	40	80.7

Таблица 4. Линейный диапазон (ЛД), квадрат коэффициента линейной корреляции (R^2), ПКО и СКО (%) при ПКО (n=6).

Analytes	ЛД нг/мл	R^2	ПКО нг/мл	СКО (%) при ПКО (n=6)
Сульфадиазин	0.01~10.0	0.9943	0.01	5.41
Сульфатиазол	0.01~10.0	0.9950	0.01	6.25
Сульфапиридин	0.01~10.0	0.9936	0.01	4.77
Сульфизоксазол	0.01~10.0	0.9958	0.01	4.90
Сульфаметизол	0.01~10.0	0.9943	0.01	3.22
Сульфаметазин	0.01~10.0	0.9950	0.01	2.15
Сульфахлорпидазин	0.01~10.0	0.9948	0.01	6.54
Сульфаметоксазол	0.01~10.0	0.9934	0.01	7.03
Сульфамонотоксин	0.01~10.0	0.9972	0.01	6.05
Сульфадиметоксин	0.01~10.0	0.9958	0.01	7.12
Сульфахиноксалин	0.01~10.0	0.9959	0.01	5.79

Заключение

Разработан простой и чувствительный метод ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения 11 сульфаниламидов в мёде. Предложенная процедура пробоподготовки обеспечивает хорошую степень извлечения (>80%) для всех определяемых компонентов. Установленные значения ПКО для всех сульфаниламидов равны 0.01 нг/мл (0.01 мкг/кг), что на несколько порядков ниже значений предельно допустимых концентраций (ПДК), указанных в отечественных и зарубежных нормативных документах.

Scheltec авторизованный дистрибьютор PerkinElmer, Inc. в странах СНГ, Грузии и Монголии
<http://www.scheltec.ru>

PerkinElmer, Inc.
940 Winter Street
Waltham, MA 02451 USA
P: (800) 762-4000 or
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



For a complete listing of our global offices, visit www.perkinelmer.com/ContactUs

Copyright ©2017, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.