



APPLICATION NOTE

**Жидкостная
хроматография /
Масс-спектрометрия**

Авторы

Xia Geng
Lizhong Yang
PerkinElmer, Inc.
Shanghai, China
Feng Qin
PerkinElmer, Inc.
Woodbridge,
Ontario, Canada

Определение тринадцати бета-агонистов в мясе методом ВЭЖХ-МС/МС

Введение

Бета - агонисты (β – агонисты или β -адреностимуляторы) - группа гормональных препаратов, стимулирующих адренергические рецепторы, которая применяется в медицине для лечения таких заболеваний как астма. При использовании во время приступа астмы лекарство способствует открытию дыхательных путей, облегчая симптомы одышки [1]. В животноводстве бета-агонисты используются в качестве стимуляторов роста животных, ускоряя метаболизм и производство белка в скелетных мышцах [2].

Применительно к безопасности пищевой продукции использование β -агонистов в качестве стимуляторов роста животных запрещено или регламентируется законодательством в большинстве стран мира, т.к. данные препараты могут нанести вред здоровью человека.

Во многих странах приняты нормы Codex Alimentarius 2012 (Пищевой Кодекс – свод пищевых международных стандартов, принятых Международной комиссией ФАО/ВОЗ), согласно которому максимально допустимый уровень β -агониста рактопamina в говядине и свинине не должен превышать 10 мкг/кг. В тоже время в некоторых странах, например в Российской Федерации, Китае, Тайване и некоторых странах ЕС, использование данного препарата в животноводстве полностью запрещено [3]. В большинстве стран мира для соблюдения нормативных ограничений созданы специальные программы мониторинга β -агонистов в животноводстве.

Контроль за соблюдением регуляторных требований по β -агонистам требует использования высокочувствительного и селективного аналитического метода. В

данной статье представлен метод количественного определения тринадцати β -агонистов в мясе с помощью ВЭЖХ-МС/МС PerkinElmer УВЭЖХ LX50 с QSight 220 МС/МС детектором. Для компенсации матричных эффектов и улучшения повторяемости и воспроизводимости результатов использовали изотопно-меченные внутренние стандарты. Установленные пределы количественного определения (ПКО) β -агонистов полностью удовлетворяют любым регуляторным требованиям по содержанию данных компонентов в мясной продукции.

Экспериментальная часть

Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ LX-50 (PerkinElmer) с масс-спектрометрическим детектором QSigh 220 (масс-анализатор - тройной квадруполь) (PerkinElmer). Управление прибором, сбор и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Simplicity 3Q™ (PerkinElmer).

Стандартные растворы.

Для приготовления калибровочных растворов использовали реагенты и растворители чистоты «для ВЭЖХ», β -агонисты и изотопно-меченные внутренние стандарты - кленбутерол-D₉, сальбутамол-D₃ и рактопамин-D₅ были приобретены у Sigma-Aldrich.

Исходные растворы индивидуальных компонентов с концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением твердых стандартов в метаноле. Основной раствор стандартных образцов с концентрацией 1 мкг/мл для каждого компонента готовили из аликвот исходных растворов. Соответствующие калибровочные растворы готовили из аликвот основного раствора. Рабочий раствор внутренних стандартов с концентрацией 10 мкг/мл готовили из аликвот исходных растворов. Для предотвращения разложения компонентов все растворы хранили в холодильнике.

Пробоподготовка.

Репрезентативный образец мяса гомогенизировали. Два грамма гомогенизированного образца мяса помещали в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, добавляли 8 мл буферного раствора ацетата натрия с концентрацией 0.2 моль/л (рН = 5.2) и тщательно перемешивали. Затем добавляли 50 мкл раствора глюкуронидазы/арилсульфатазы и перемешивали содержимое пробирки, после чего пробирку помещали в водяную баню с температурой 37°C на 12 часов. После проведения гидролиза в пробирку добавляли 100 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта, содержимое пробирки встряхивали в течение 15 мин и центрифугировали при 5000 об/мин течение 10 мин. После центрифугирования отбирали 4 мл супернатанта, помещали его в пробирку для центрифугирования объемом 10 мл, добавляли 5 мл раствора хлорной кислоты с концентрацией 0.1 моль/л, содержимое пробирки тщательно перемешивали и доводили рН раствора до 1.0±0.3 хлорной кислотой. Содержимое пробирки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин.

Супернатант переносили в пробирку для центрифугирования объемом 50 мл, доводили рН до 11 с помощью раствора гидроксида натрия концентрацией 10 моль/л. Затем в пробирку добавляли 10 мл насыщенного раствора хлорида

натрия и 10 мл смеси изопропанол : этилацетат в соотношении 3:2. Содержимое пробирки встряхивали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования отбирали органический слой и упаривали растворитель в токе азота при температуре 40°C. Сухой остаток растворяли в 5 мл ацетатного буфера (pH = 5.2) и проводили процедуру очистки с помощью твердофазной экстракции - ТФЭ.

Очистка пробы с помощью ТФЭ.

- 1.** Катионообменный картридж ТФЭ (3 см³) устанавливали на вакуумный манифолд (вакуумная установка для ТФЭ с регулировкой скорости потока) и кондиционировали, пропуская через картридж 2 мл метанола, а затем 2 мл дистиллированной воды.
- 2.** Наносили раствор пробы на картридж.
- 3.** Промывали картридж ТФЭ 2 мл дистиллированной воды, затем 2 мл раствора 2 % муравьиной кислоты и 2 мл метанола. Смывы отбрасывали, удаляли остатки растворителя с картриджа (сушили картридж).
- 4.** Определяемые вещества элюировали с картриджа 2 мл 5 % раствора аммиака в метаноле.
- 5.** Упаривали раствор досуха в токе азота при температуре 40°C. Сухой остаток растворяли в 200 мкл смеси 0.1 % водного раствора муравьиной кислоты и метанола в соотношении 95:5 и анализировали.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра представлены в таблицах 1, 2 и 3.

Таблица 1. Хроматографические условия.

Хроматографическая колонка	PerkinElmer Brownlee SPP C18, 100 × 2.1 мм, 2.7 мкм (PN: N9308404)				
Подвижная фаза	Подвижная фаза А: 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде Подвижная фаза В: 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле				
	Программа градиентного элюирования				
	Шаг	Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А	%В
	1	0	0.4	99	1
	2	0.50	0.4	99	1
	3	2.00	0.4	90	10
	4	4.50	0.4	80	20
	5	6.50	0.4	70	30
	6	7.00	0.4	50	50
	7	8.00	0.4	30	99
	8	8.50	0.4	1	99
	9	8.60	0.4	99	1
10	11.00	0.4	99	1	
Время анализа	8.0 мин; время равновесия: 3.0 мин				
Температура термостата	40 °С				
Вводимый объем	20 мкл				

Таблица 2. Параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора

Параметр	Значение
Режим ионизации	ESI +
Осушающий газ	75 единиц
Температура HSID интерфейса	320°С
Распыляющий газ	220 единиц
Напряжение ESI +	5500 В
Температура источника	500°С

Таблица 3. Параметры МС/МС метода (MRM переходы и оптимизированные параметры масс-анализатора для MRM переходов определяемых соединений.

Анализируемый компонент	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	EV(B) ¹	CCL2(B) ²	CE (эВ) ³
Кленбутерол	277.1	203.0*	11	-72	-25
	277.1	259.1	11	-56	-14
Бамбутерол	368.2	72.1	24	-104	-59
	368.2	294.1*	26	-112	-26
Мабутерол	311.1	237.0*	22	-68	-24
	311.1	293.1	19	-76	-16
Зилпатерол	262.2	185.0	18	-100	-37
	262.2	244.1*	16	-68	-17
Сальбутамол	240.2	148.1*	20	-64	-27
	240.2	222.1	20	-48	-13
Тербуталин	226.2	152.1*	20	-52	-22
	226.2	170.1	20	-60	-14
Тулобутерол	228.2	154.0*	18	-52	-25
	228.2	172.1	18	-52	-16
Цимбутерол	234.2	160.1*	15	-64	-20
	234.2	216.0	15	-52	-12
Циматерол	220.2	160.1	15	-92	-27
	220.2	202.1*	15	-48	-13
Бромбутерол	367.0	292.9*	21	-96	-28
	367.0	349.0	20	-112	-17
Рактопамин	302.2	164.1	9	-100	-22
	302.2	284.1*	9	-76	-17
Хлорпреналин	214.1	154.0*	20	-64	-26
	214.1	196.1	22	-68	-16
Кленпроперол	263.1	203.0	15	-100	-27
	263.1	245.1*	15	-60	-17
Кленбутерол-D ₉	286.1	204.0*	11	-72	-25
Сальбутамол-D ₃	243.1	151.1*	20	-64	-27
Рактопамин-D ₅	307.2	289.1*	9	-100	-22

* - Дочерний ион для количественного определения

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

² - CCL2 (Collision Cell Lens 2 voltage) – напряжение на входной линзе ячейки столкновений.

³ - CE (Collision energy) – энергия соударений.

Обсуждение результатов

Цель данной работы - оценка эффективности масс-спектрометрического QSight 220 (PerkinElmer) для определения β -агонистов в тканях животных с использованием утвержденного метода пробоподготовки.

На рисунке 1 показана хроматограмма полного ионного тока (TIC) тринадцати β -агонистов. Пики большинства определяемых компонентов имеют разрешение более единицы. Идентификацию и количественное определение компонентов проводили с помощью их уникальных MRM-переходов.

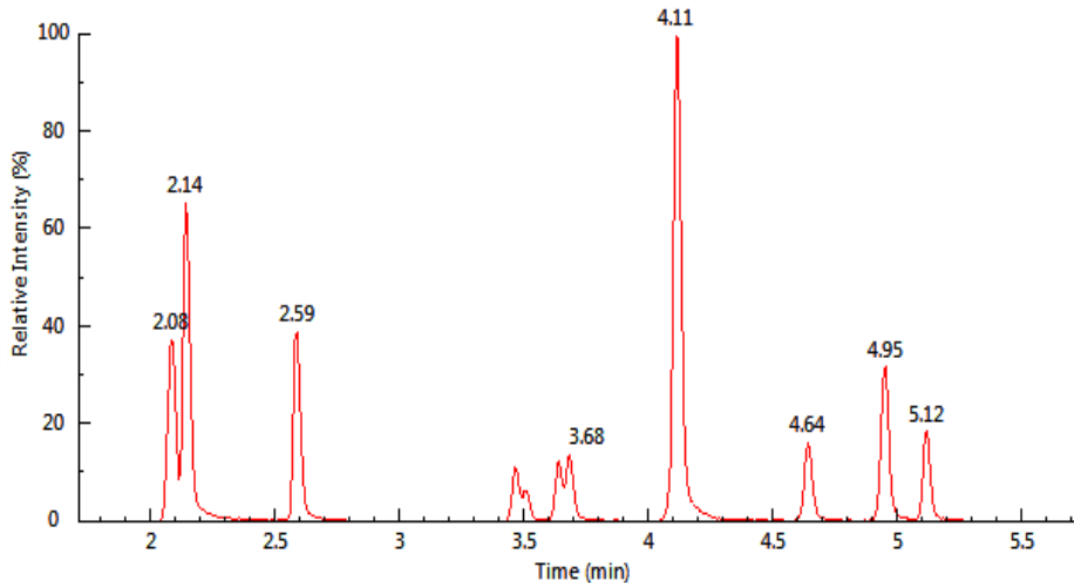


Рисунок 1. Хроматограмма полного ионного тока (TIC) тринадцати β -агонистов.

На рисунке 2 представлены MRM хроматограммы стандартного раствора тринадцати β -агонистов.

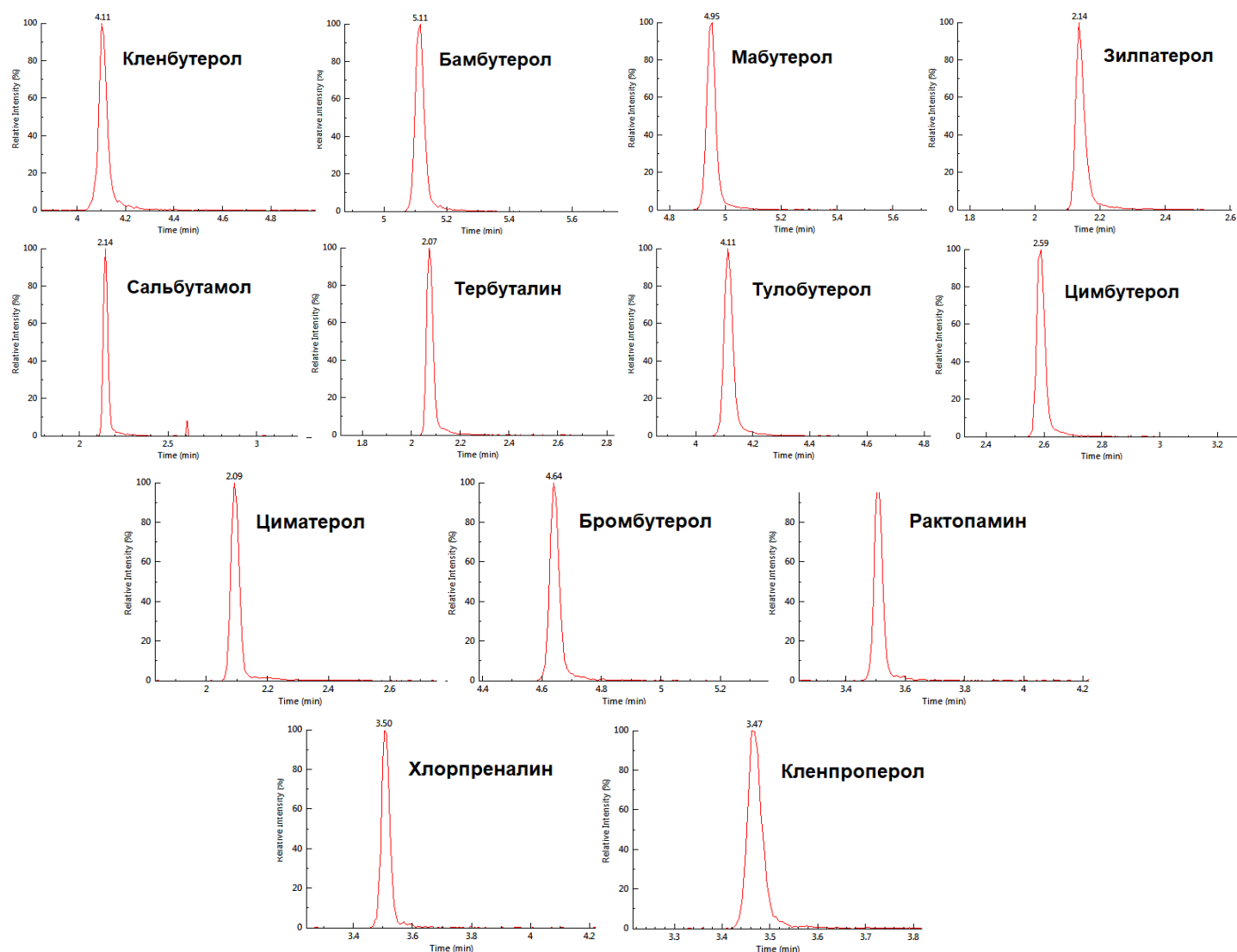


Рисунок 2. Типичные MRM хроматограммы стандартного раствора тринадцати β -агонистов с концентрацией 5 мкг/л.

Рисунок 3 демонстрирует хорошую линейность калибровочных кривых (квадрат коэффициента линейной корреляции $R^2 \geq 0.995$) в широком диапазоне концентраций (от 0.05 до 5 мкг/л).

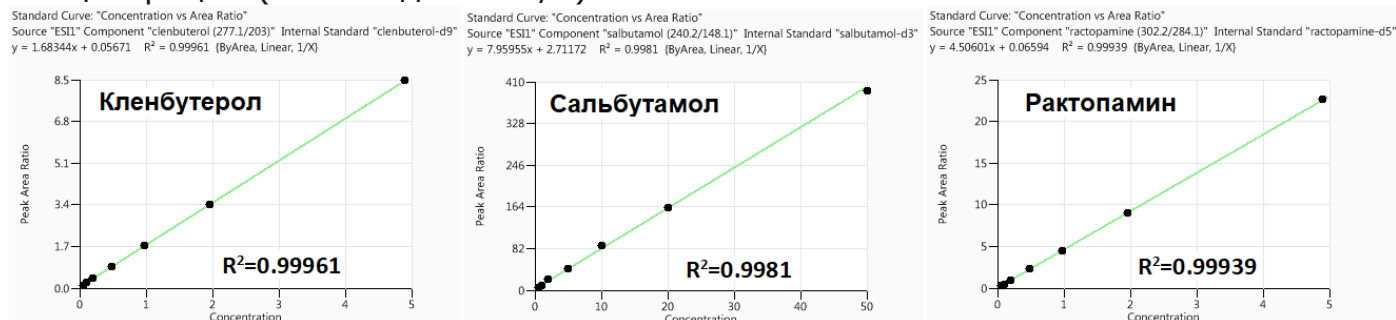


Рисунок 3. Пример калибровочных кривых определяемых компонентов.

Пределы количественного определения (ПКО) были установлены на основе значения сигнал/шум ≥ 10 для количественного иона. Полученные значения ПКО для всех определяемых β -агонистов были ниже 0,05 мкг/л.

На рисунке 4 (А и В) показаны хроматограммы образца свинины, не содержащего определяемых компонентов (А), и образца с добавкой 13 β -агонистов концентрацией 0.1 мкг/кг (В). Как видно из рисунка 4 А в чистом образце свиной матрицы определяемые соединения не обнаружены, тогда как в образце с добавкой (0.1 мкг/кг) обнаружены все 13 β -агонистов.

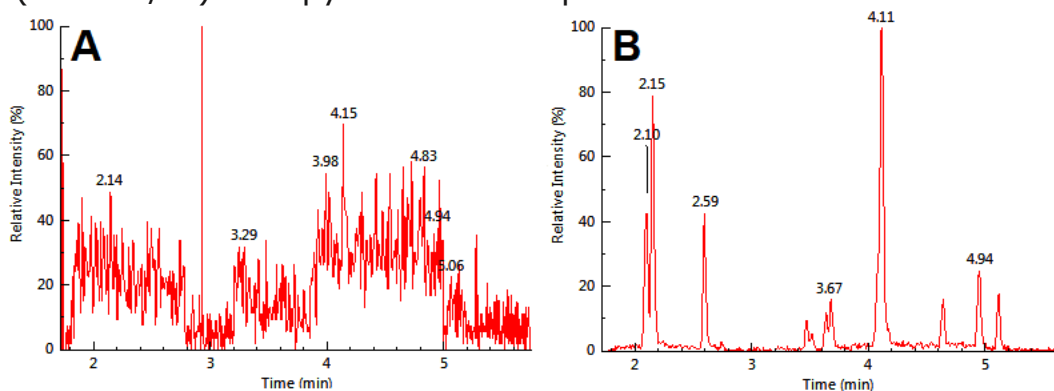


Рисунок 4. Хроматограмма полного ионного тока (TIC) образца свинины не содержащего определяемых компонентов (бланк) (А) и образца с добавкой 13 β -агонистов концентрацией 0.1 мкг/кг (В).

Для оценки степени извлечения компонентов использовались образцы свинины с концентрациями целевых компонентов 0.1, 0.5 и 2 мкг/кг, результаты представлены в таблице 4. Степень извлечения для всех компонентов составила 79.5 – 114.3% при СКО менее 13% (при n=3).

Таблица 4. Степень извлечения компонентов и СКО в образцах свинины с добавкой определяемых β -агонистов (при n=3).

Анализируемый компонент	0.1 мкг/кг		0.5 мкг/кг		2 мкг/кг	
	Степень извлечения (%)	СКО (%)	Степень извлечения (%)	СКО (%)	Степень извлечения (%)	СКО (%)
Бамбутерол	82.3	6.9	85.6	8.2	88.5	6.2
Бромбутерол	90.2	10.3	86.1	11.9	91.7	9.5
Циматерол	86.5	11.6	82.3	12.9	88.2	12.6
Цимбутерол	93.8	7.3	91.8	8.5	95.7	6.5
Кленбутерол	97.7	8.9	108.6	7.1	114.3	7.6
Кленпроперол	90.8	10.8	86.2	12.8	89.7	11.8
Хлорпреналин	82.6	11.5	79.5	10.9	83.1	12.6
Мабутерол	103.4	8.4	112.5	10.8	108.5	11.1
Рактопамин	105.6	11.8	100.5	7.9	112.5	8.2
Сальбутамол	95.8	7.1	99.8	8.7	97.9	10.7
Тербуталин	96.9	11.8	113.7	9.1	93.8	8.7
Тулобутерол	86.4	12.3	82.1	10.6	88.3	10.5
Зилпатерол	89.7	11.2	90.5	9.6	107.1	10.1

Заключение

Разработан чувствительный и селективный метод количественного определения тринадцати β -агонистов в мясе с помощью УВЭЖХ LX50 и масс-спектрометрического детектора QSight 220 (PerkinElmer). Установленные валидационные характеристики метода отвечают требованиям нормативных документов, в том числе и Таможенного союза стран ЕАЭС [4, 5], регламентирующих содержание определяемых β -агонистов в мясе.

Список литературы

[1] Shore, S., & Drazen, J. (2003). β -Agonists and asthma: too much of a good thing? The Journal of Clinical Investigation, 112(4), 495–497.

[2] Dilger, A. (2015). Beta-Agonists: What Are They and Why Do We Use Them in Livestock Production? American Meat Association Fact Sheet. Retrieved from https://meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/fact-sheets/beta-agonists---dilger-20158d82e7711b766618a3fcff0000a508da.pdf?sfvrsn=69f481b3_0.

[3] Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. (2018). (CX/MRL 2-2018). Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf>

[4] ГОСТ 33607-2015 Мясо и мясные продукты. Определение бета-агонистов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

[5] ГОСТ 33486-2015 Продукты пищевые, комбикорма, объекты биологические животного происхождения. Метод определения содержания β -адреностимуляторов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

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 ©2020, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.