



APPLICATION NOTE

Жидкостная Хроматография / Масс-спектрометрия

Автор:
Cheng-Yuan Cai
PerkinElmer, Inc.
Shanghai, China

Селективный ВЭЖХ-МС/МС метод определения маркеров свинины

Введение

Фальсификация продуктов питания – одна из основных проблем последнего десятилетия. Для снижения себестоимости продукции недобросовестные производители, как правило, используют более дешевые ингредиенты, не предусмотренные рецептурой данного пищевого продукта, или частично заменяют ими оригинальные компоненты. Одним из примеров такой фальсификации может служить замена говядины, баранины и более дорогих сортов мяса на свинину. Наиболее часто такая ситуация встречается для мясных полуфабрикатов и субпродуктов, где замену выявить сложнее.

Кроме того, употребление свинины и продуктов питания, в состав которых она входит, даже в незначительных количествах недопустимо для людей, исповедующих ислам.

Таким образом, разработка метода, позволяющего качественно и количественно определять биомаркеры свинины в продуктах питания, является важной задачей [1, 2]. Цель данного исследования – разработка селективного и чувствительного ВЭЖХ-МС/МС метода определения трех пептидов, которые могут служить биомаркерами свинины в мясных продуктах.

Экспериментальная часть

Оборудование и программное обеспечение

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

Пробоподготовка

К двум граммам гомогенизированного образца добавляли 5 мл раствора для экстракции [1-4], образец встряхивали и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин. 0.5 мл супернатанта восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ), алкилировали йодацетамидом в темном месте, добавляли 800 мкл смеси буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометана (Tris-HCl) с концентрацией 25 мМоль/л (pH = 8.0) и модифицированного трипсина чистоты «для секвенирования». Для проведения

полного расщепления инкубировали содержимое пробирки при 37°C и медленном встряхивании в течение 12 часов. Ферментативную активность подавляли, добавляя 20 мкл муравьиной кислоты. Очистку образца проводили с помощью твердофазной экстракции (ТФЭ). После очистки фракцию, содержащую пептиды, концентрировали, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

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

Таблица 1. Хроматографические условия.

Хроматографическая колонка	PerkinElmer Brownlee SPP C18, 100 × 2.1 мм, 2.7 мкм			
Подвижная фаза	Подвижная фаза А (ПФ А): 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде Подвижная фаза В (ПФ В): 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле			
Программа градиентного элюирования	Время (мин)	Поток (мл/мин)	ПФ А (%)	ПФ В (%)
	0	0.4	98	2
	0.8	0.4	98	2
	14	0.4	60	40
	15	0.4	2	98
	17.5	0.4	2	98
	17.6	0.4	98	2
	20	0.4	98	2
Температура термостата	40°C			
Вводимый объем	10 мкл			

Таблица 2. Параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора

Параметр	Значение
Режим ионизации	ESI +
Осушающий газ	100 единиц
Температура HSID интерфейса	320°C
Распыляющий газ	180 единиц
Напряжение ESI +	5000 В
Температура источника	400°C
Режим работы масс-анализатора	MRM

Обсуждение результатов

Специфичность трех выбранных пептидов, имеющих уникальные MRM-переходы, подтверждалась сравнением результатов, полученных при анализе образцов свинины (рисунок 1) и образцов говядины, баранины, курицы и утки (рисунок 2). Результаты показали, что три выбранных пептида являются специфичными (уникальными) для свинины и могут использоваться в качестве ее биомаркера в мясных продуктах.

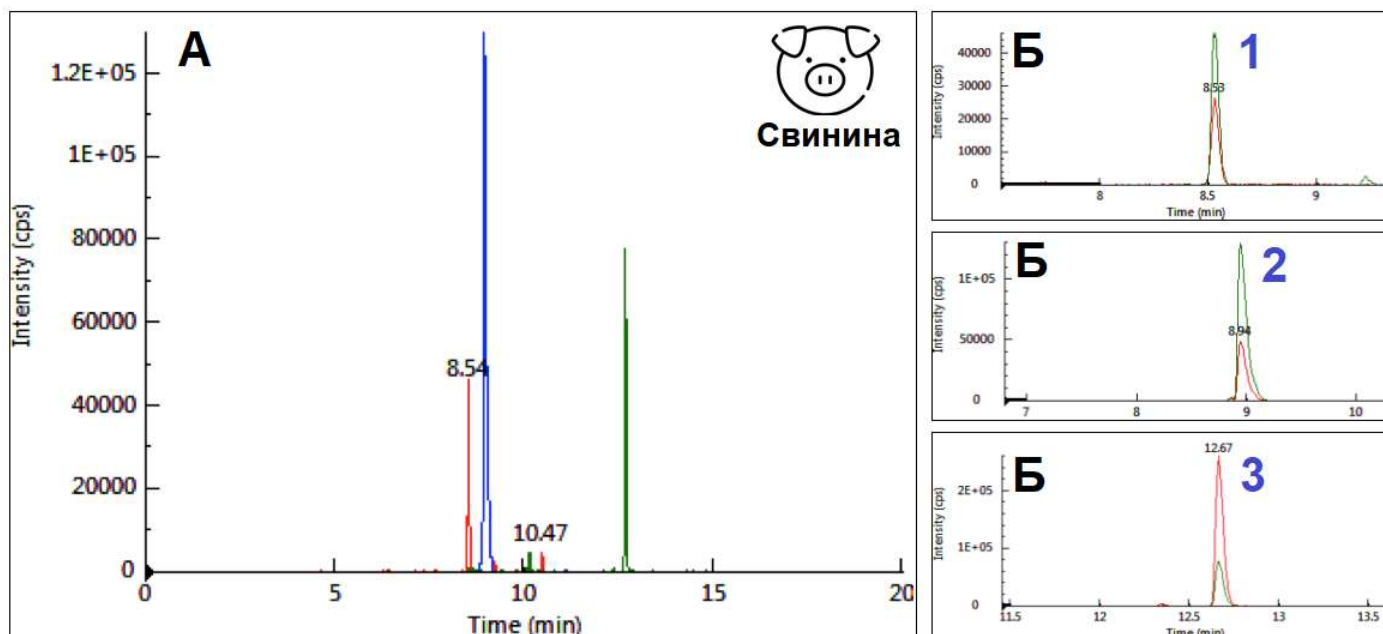


Рисунок 1. Типичные хроматограммы экстракта сырой свинины в MRM режиме: А - хроматограмма полного ионного тока. Б – хроматограммы MRM переходов выбранных пептидов: пептид 1 ($t_r = 8.5$), пептид 2 ($t_r = 8.9$), пептид 3 ($t_r = 12.7$), где t_r – время удерживания.

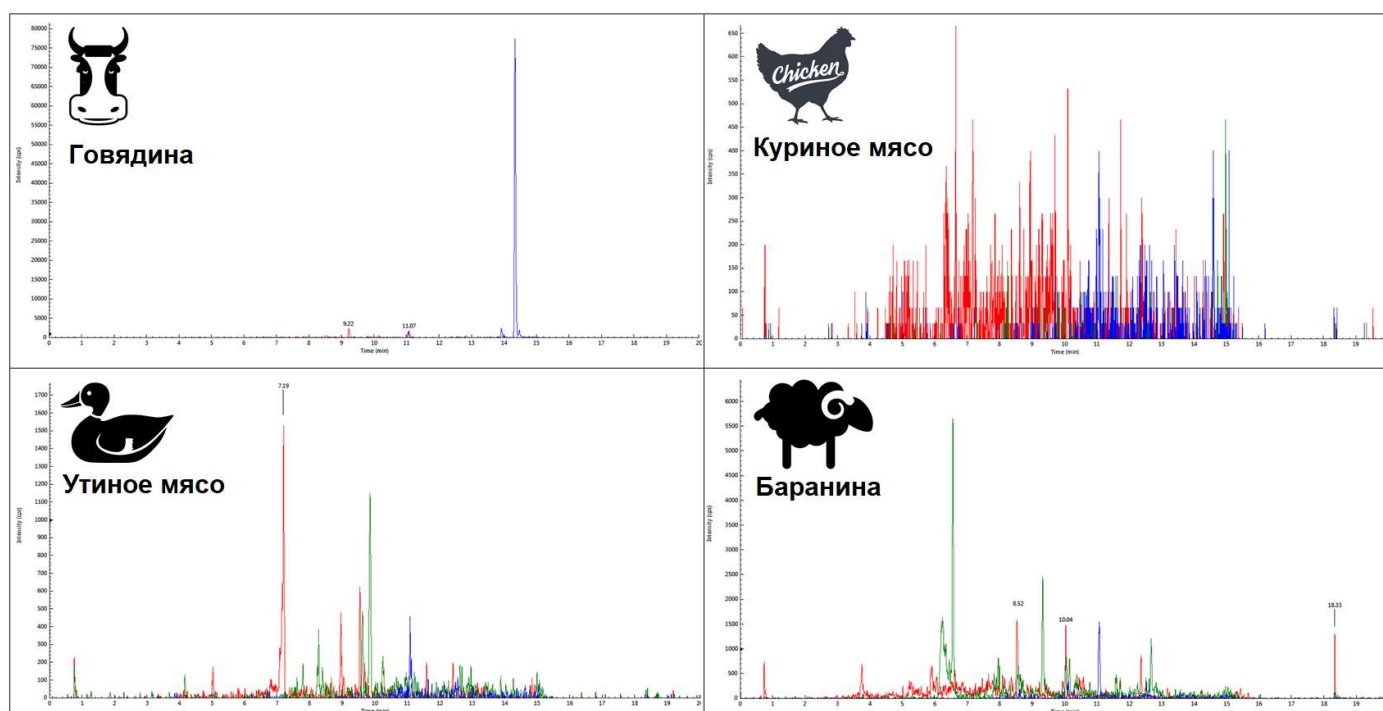


Рисунок 2. Типичные MRM хроматограммы говядины, куриного мяса, утиного мяса и баранины.

Термическую стабильность пептидов-биомаркеров оценивали сравнением интенсивностей соответствующих пиков на хроматограммах экстрактов сырой и вареной свинины (hard-boiled). Как видно из рисунка 3 интенсивность пиков пептидов-биомаркеров после термической обработки свинины менялась незначительно, что свидетельствует об их относительной термической стабильности.

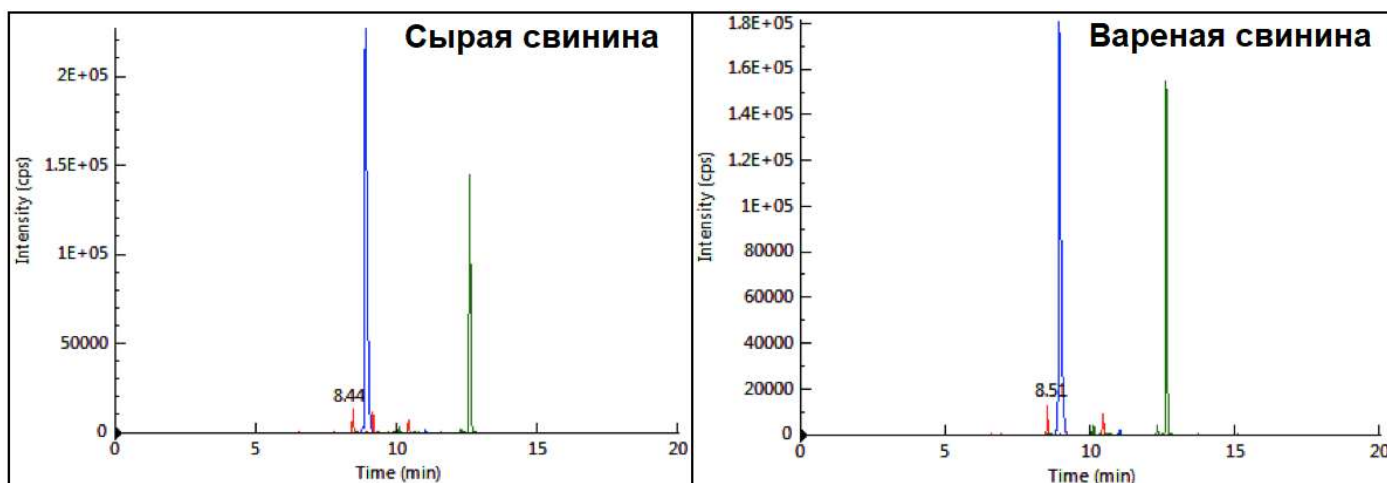


Рисунок 3. Типичные MRM хроматограммы экстрактов сырой и вареной свинины.

Рисунок 4 демонстрирует хорошую линейность калибровочных кривых пептидов-маркеров (квадрат коэффициента линейной корреляции $R^2 \geq 0.995$) при содержании свинины в мясных смесях от 1 до 100% (масс). Полученный предел количественного определения (ПКО) составил 1% (масс).

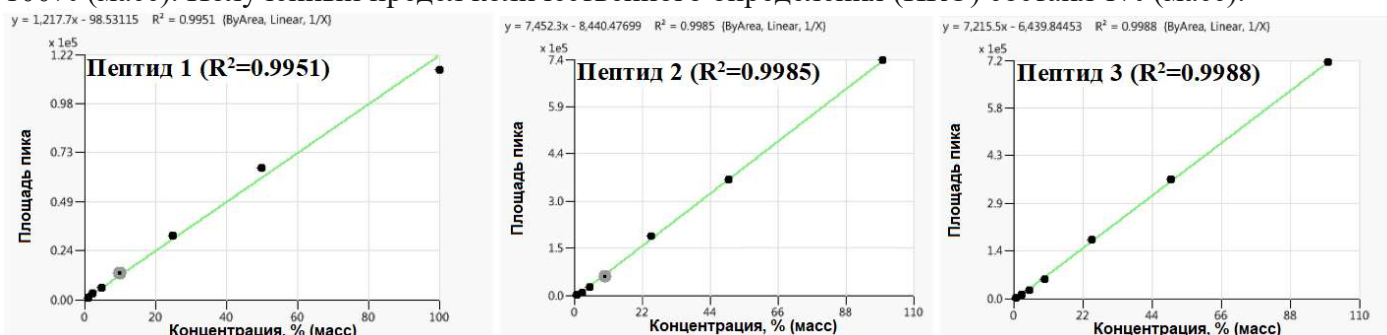


Рисунок 4. Калибровочные кривые пептидов – маркеров свинины.

Заключение

Разработан селективный ВЭЖХ-МС/МС метод определения трех пептидов-маркеров свинины в мясе и мясных продуктах. Благодаря оптимизированной пробоподготовке, разработанный метод может использоваться для определения свинины с содержанием по массе до 1% как в сырых, так и готовых к употреблению мясных продуктах и может быть полезен для выявления фальсификации мясной продукции.

Список литературы

- [1] Christoph v B, Jörg n, Dietmar W, et al. J. Agric. Food Chem. 2013, 61, 11986–11994.
- [2] Christoph v B, Jens B, Hans-Ulrich H, et al. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 9428–9435.
- [3] Andrew D. W, Yvonne G, Neil M. R, et al. Anal. Chem. 2015, 87, 10315–10322.
- [4] Yvonne G, Andrew D. W, Neil M. R, et al. J. Visu. Expert. 2016, 115, e54420, 1-7.

Scheltec авторизованный дистрибьютор PerkinElmer 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 ©2018, PerkinElmer, Inc. All rights reserved. PerkinElmer® is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.