



## APPLICATION NOTE

### Жидкостная хроматография / Масс-спектрометрия

#### Авторы:

**Xia Geng**

PerkinElmer, Inc. Shanghai, China

**Avinash Dalmia**

PerkinElmer, Inc. Shelton, CT

**Saba Hariri Feng Qin**

PerkinElmer, Inc. Ontario, Canada

## Определение остаточного содержания метаболитов нитрофуранов в морепродуктах методом ВЭЖХ-МС/МС

### Введение

Нитрофураны – синтетические антибактериальные препараты широкого спектра действия, часто используемые в аквакультурной промышленности для борьбы с вредоносными бактериями, простейшими и стимуляции роста морепродуктов. Попадая в организм нитрофураны быстро превращаются в метаболиты, которые легко связываются с белками. Связанные метаболиты очень стабильны и сохраняются даже в условиях термической обработки, поэтому являются индикаторами использования нитрофурановых препаратов при производстве продуктов питания. Поскольку метаболиты обладают сильным мутагенным и канцерогенным действием, понижают уровень белка в плазме крови и способствуют анемии, использование нитрофурановых препаратов и их метаболитов в производстве продуктов питания запрещено в большинстве стран мира, включая США, страны ЕС, Китай и Российскую Федерацию. Во многих странах нитрофураны относятся к запрещенным препаратам класса А с MRPL (Minimum Required Performance Limit) равным 1,0 мкг/кг. Согласно Технического регламента 040/2016 Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции", содержание нитрофуранов в пищевой продукции аквакультуры животного происхождения, в том числе, в рыбе, не допускается на уровне определения методов.

Наиболее широко используемые нитрофураны и их метаболиты, образующие стабильные связи с белками представлены в таблице 1.

**Таблица 1. Нитрофураны и их метаболиты.**

<b>Нитрофуран</b>	<b>Метаболит</b>
<b>Фуразолидон</b>	<b>2-Амино-3-оксазолидинон (АОЗ)</b>
<b>Нитрофуразон (фурацилин)</b>	<b>Семикарбазид (СЕМ)</b>
<b>Фуралтадон</b>	<b>2-Амино-5-морфолинометил-2-оксазолидинон (АМОЗ)</b>
<b>Нитрофурантоин (фурадонин)</b>	<b>1-Аминогидантоин (АГД)</b>

В условиях ионизации методом электроспрей (ESI) для метаболитов нитрофуранов характерна невысокая эффективность ионизации, что в сочетании с их низкими молекулярными массами, обуславливающими достаточно высокий уровень фонового сигнала при анализе многих пищевых матриц, приводит к снижению чувствительности ВЭЖХ-МС/МС метода. Для повышения эффективности ионизации и молекулярного веса метаболитов использовали дериватизацию определяемых соединений с помощью 2-нитробензальдегида (2-НБА) [1]. Дериватизация метаболитов является важным звеном для достижения низких пределов количественного определения ( $\leq 1,0$  мкг/кг) в пробах пищевых продуктов при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС.

Цель данной работы - определение пределов количественного определения (ПКО) метаболитов нитрофуранов в морепродуктах при использовании ВЭЖХ-МС/МС PerkinElmer LX50-QSight 210 и стандартной процедуры пробоподготовки.

### **Экспериментальная часть**

#### **Оборудование и программное обеспечение**

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ LX50 с масс-спектрометрическим детектором QSight 210 PerkinElmer (масс-анализатор - тройной квадруполь).

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

#### **Реактивы, стандартные растворы и пробоподготовка.**

##### *Растворители и реактивы*

Для приготовления стандартных растворов использовали растворители и реагенты класса «для ВЭЖХ». Стандартные образцы СЕМ, АОЗ, АГД, АМОЗ и стабильные изотопно-меченные внутренние стандарты СЕМ- $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}_2$ , АГД- $^{13}\text{C}_3$ , АОЗ- $\text{D}_4$ , АМОЗ- $\text{D}_5$  производства Sigma-Aldrich Inc.

Исходные растворы индивидуальных компонентов готовили растворением навески стандартного образца в метаноле, получая растворы с концентрацией 1 мг/мл. Рабочий раствор готовили из аликвот индивидуальных растворов стандартных образцов, используя в качестве растворителя метанол.

Калибровочные растворы готовили из рабочего раствора.

Рабочий раствор внутренних стандартов (IS) с концентрацией 100 нг/мл готовили из аликвот индивидуальных растворов внутренних стандартов с концентрацией 100 мкг/мл, используя в качестве растворителя метанол.

Все исходные и рабочие растворы хранились в холодильнике.

##### *Пробоподготовка*

Репрезентативный образец рыбы (морепродукта) гомогенизировали. Два грамма гомогенизированного образца рыбы помещали в пробирку для центрифугирования вместимостью 50 мл, добавляли 0.05 мл рабочего раствора внутренних стандартов и тщательно встряхивали содержимое пробирки в течение 50 сек. Затем добавляли 5 мл 0.2 М соляной кислоты и 0.15 мл раствора 2-НБА с концентрацией 0.05 моль/л и выдерживали пробирку при температуре 37°C и постоянном встряхивании в течение 16 часов для полной дериватизации определяемых соединений. Затем содержимое пробирки охлаждали до комнатной температуры, доводили pH раствора до 7 - 7.5 1М раствором  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (~ 3-5 мл) и встряхивали содержимое пробирки в течение 50 сек. После стабилизации pH раствора (7-7.5) добавляли 4 мл этилацетата, встряхивали пробирку в течение 50 сек и центрифугировали в течение 5 мин при 4000 об/мин, после чего отбирали супернатант. Процедуру экстракции образца этилацетатом повторяли еще раз. Объединенный экстракт помещали в пробирку для центрифугирования вместимостью 10 мл и центрифугировали в течение 5 минут при 4000 об/мин,

затем отбирали органический слой и упаривали этилацетат досуха в токе азота при 40°C. Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси метанола и воды в соотношении 95:5, фильтровали и анализировали.

**Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.**

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

**Таблица 2. Хроматографические условия и параметры источника ионизации.**

<b>Хроматографическая колонка</b>	PerkinElmer Quasar™ AQ, 100×2.1 mm, 1.7 μm (Cat#N9308857)				
<b>Подвижная фаза</b>	<b>A:</b> 0.5 mM ацетат аммония в воде <b>B:</b> Метанол				
	<b>Программа градиентного элюирования</b>				
	<b>Шаг</b>	<b>Время (мин)</b>	<b>Поток (мл/мин)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
	1	0	0.4	60	40
	2	0.25	0.4	60	40
	3	6.25	0.4	40	60
	4	7.00	0.4	1	99
	5	7.10	0.4	60	40
	6	10	0.4	60	40
<b>Время анализа</b>	7.0 мин; время равновесия 3.0 мин				
<b>Температура термостата</b>	40°C				
<b>Вводимый объем</b>	20 мкл				
<b>Параметры источника ионизации</b>					
<b>Режим ионизации</b>	ESI+				
<b>Напряжение ESI +</b>	5000 V				
<b>Осушающий газ</b>	75 единиц				
<b>Распыляющий газ</b>	220 единиц				
<b>Температура HSID интерфейса</b>	320°C				
<b>Температура источника</b>	500°C				

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

Компонент	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	EV(B) <sup>1</sup>	CCL2(B) <sup>2</sup>	CE (эВ) <sup>3</sup>
НБА-СЕМ	209.1	166.00*	26	-44	-11
	209.1	192.00	18	-40	-13
НБА-СЕМ- <sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	212.1	168.00*	26	-44	-11
НБА-АГД	249.1	104.00	28	-48	-30
	249.1	134.00*	30	-44	-14
НБА-АГД- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	252.1	134.00*	30	-44	-14
НБА-АОЗ	236.1	104.00	28	-48	-32
	236.1	134.00*	30	-48	-14
НБА-АОЗ-D <sub>4</sub>	240.1	134.00*	30	-48	-14
НБА-АМОЗ	335.2	128.00	12	-72	-32
	335.2	291.00*	6	-72	-13
НБА-АМОЗ-D <sub>5</sub>	340.2	296.00*	6	-72	-13

\* - Дочерний ион для количественного определения

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

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

<sup>3</sup> - CE (Collision energy) – энергия соударений.

### Обсуждение результатов

Типичные MRM хроматограммы калибровочного раствора с концентрацией определяемых компонентов 1 мкг/л представлены на рисунке 1.

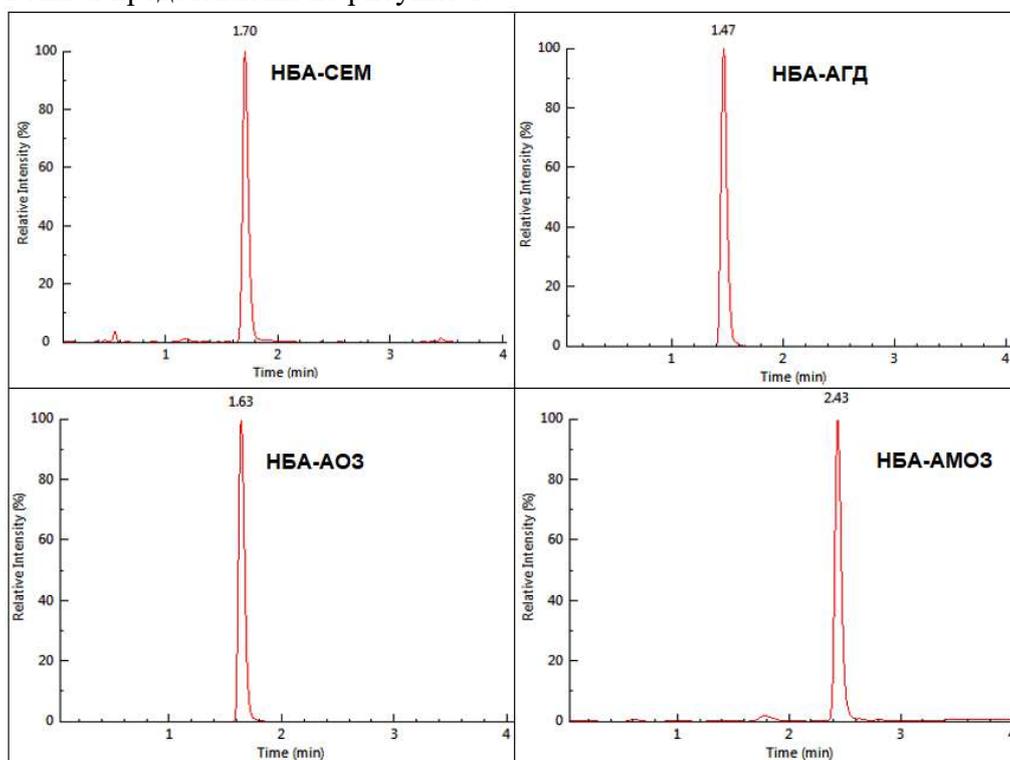


Рисунок 1. MRM хроматограммы калибровочного раствора с концентрацией 1 мкг/л.

Калибровочные кривые НБА-СЕМ, НБА-АГД, НБА-АОЗ и НБА-АМОЗ показаны на рисунке 2. Калибровочные кривые имели хорошую линейность в широком диапазоне концентраций – квадрат коэффициента линейной корреляции определяемых компонентов для диапазона концентраций от 0.05 до 10 мкг/л был более 0.995 ( $R^2 > 0.995$ ).

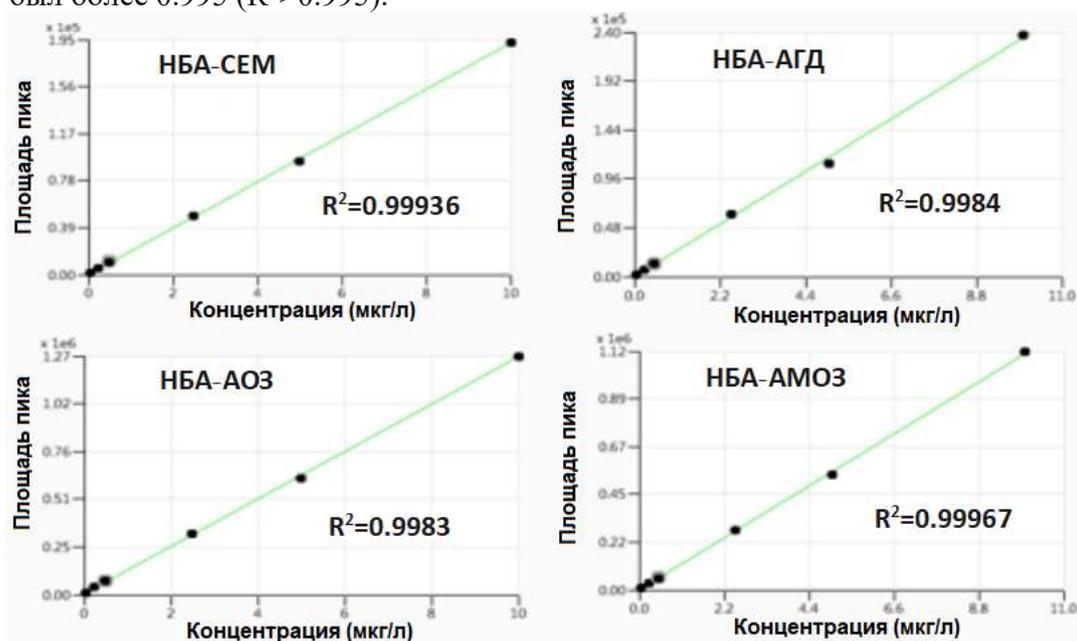


Рисунок 2. Калибровочных кривые НБА-СЕМ, НБА-АГД, НБА-АОЗ и НБА-АМОЗ.

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывали при соотношении сигнал/шум  $\geq 10$  для MRM перехода, используемого для количественного определения. Установленные значения ПКО для всех определяемых компонентов были ниже 0.05 мкг/кг, в 20 раз ниже значения MRPL (1 мкг/кг). Разработанный метод использовали для определения метаболитов нитрофуранов в образцах морепродуктов. На рисунке 3 представлены MRM хроматограммы анализа образца рыбы с содержанием целевых компонентов 0.5 мкг/кг (образец с добавкой).

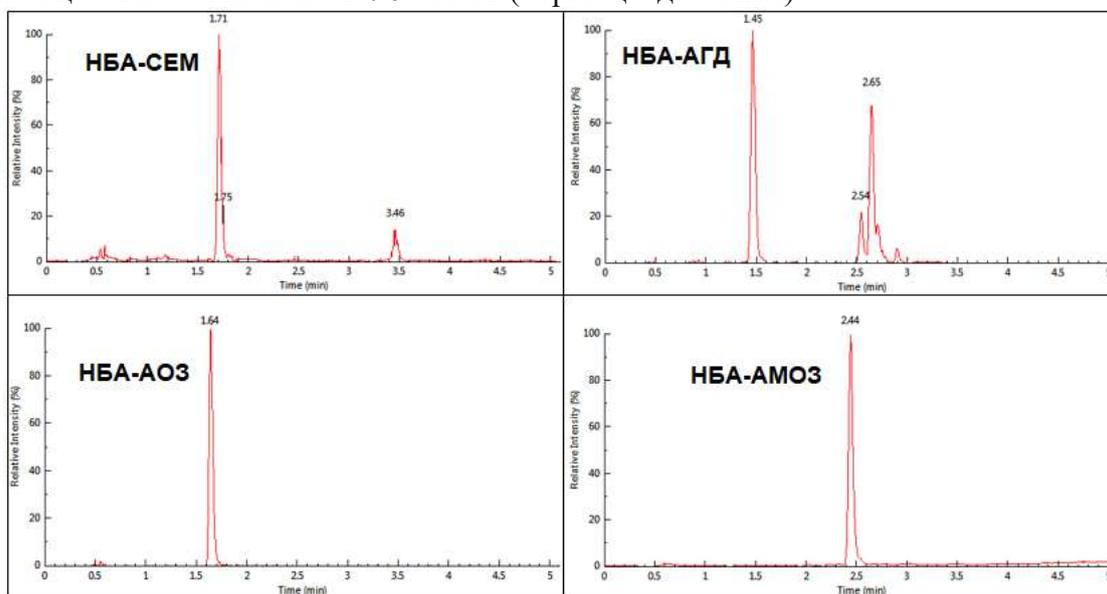


Рисунок 3. MRM хроматограммы анализа образца рыбы с содержанием метаболитов нитрофуранов 0.5 мкг/кг.

## Заключение

Разработан простой и чувствительный метод определения метаболитов нитрофуранов в морепродуктах с помощью ВЭЖХ-МС/МС PerkinElmer LX50-QSigh 210. Установленные пределы количественного определения метаболитов нитрофуранов значительно ниже (в 20 раз) требований нормативных документов, в том числе и Таможенного союза стран ЕАЭС, регламентирующих их содержание в морепродуктах. Использование стандартной процедуры пробоподготовки позволяет применять данный метод не только для анализа морепродуктов, но и других продуктов питания, т.к. он полностью отвечает требованиям ГОСТ 32014-2012 [3].

## Список литературы

[1] Announcement No. 783 of the Ministry of Agriculture, Jan 2016, China.

[2] Guidance document on the analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. European Commission SANTE document 11945/2015.

[3] ГОСТ 32014-2012 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания метаболитов нитрофуранов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.

**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](http://www.perkinelmer.com)



For a complete listing of our global offices, visit [www.perkinelmer.com/ContactUs](http://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.