



APPLICATION NOTE

Жидкостная хроматография /
Масс-спектрометрия

Авторы:

Jingcun Wu

Josh Ye

Erasmus Cudjoe

Feng Qin

PerkinElmer, Inc.

Woodbridge, Canada

Определение ветеринарных препаратов в курином мясе методом ВЭЖХ-МС/МС

Введение

Ветеринарные препараты широко используются для профилактики и лечения заболеваний в животноводстве, что позволяет производить качественные продукты питания. Неправильное или чрезмерное использование ветеринарных препаратов может привести к их переносу в продукты питания, представляя опасность для здоровья людей. Остаточное содержание ветеринарных препаратов в пище может делать ее токсичной, вызывать побочные эффекты, и приводить к развитию лекарственно-устойчивых бактерий. В связи с этим нормативные требования по использованию антибиотиков в животноводстве приняты практически во всем мире. Например, в странах ЕС, Канаде, Китае установлены предельно допустимые концентрации (ПДК) (MRLs - maximum residue levels) лекарственных препаратов в пищевых продуктах, а в США это так называемые «допуски» или уровни толерантности (tolerances) [1-5]. Для соблюдения установленных нормативов для внутренних и международных продовольственных рынков содержание ветеринарных препаратов в пищевых продуктах контролируется государственными и частными контрактными лабораториями.

Контроль ветеринарных препаратов в продуктах питания – сложная задача. Прежде всего, это обусловлено их большим разнообразием и сложностью матрицы. Еще недавно для решения данной задачи аналитики вынуждены были использовать целый набор методов. Как правило, для каждого класса (группы родственных по химической структуре) препаратов использовались подходящие способы пробоподготовки и методы анализа («моно-классовые» методы) [6]. Благодаря прогрессу в области аналитических технологий «моно-классовые» методы уходят в прошлое, уступая место универсальным методам, позволяющим одновременно анализировать остаточные количества препаратов различных классов (MMMs - multiclass, multiresidue methods) [7-19]. Цель данного исследования – разработка простого, универсального и чувствительного метода для количественного определения более 70 ветеринарных препаратов в курином мясе.

Для мультикомпонентного определения ветеринарных препаратов в пищевых продуктах в некоторых работах [7, 8, 15] использовался метод пробоподготовки QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe - Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно). В ряде исследований после экстракции пробы различными растворителями, например, смесью ацетонитрил/вода в соотношении 4/1 [9-14] для очистки экстракта авторы использовали осаждение белков при низкой температуре [16], обезжиривание гексаном [17] или применяли твердофазную экстракцию (ТФЭ) [18].

Правильно подобранная процедура пробоподготовки позволяет получать корректные результаты и минимизировать загрязнение аналитической системы, что снижает стоимость ее обслуживания. Однако, в случае мультикомпонентного определения веществ, имеющих разную природу, подобрать оптимальную процедуру пробоподготовки, обеспечивающую приемлемую степень извлечения веществ различных классов, задача крайне сложная. Часто степень извлечения некоторых из определяемых компонентов может быть достаточно низкой [8-14], что обусловлено их потерей на стадии экстракции или очистки. Кроме того, сама процедура пробоподготовки, включающая в себя стадии очистки экстракта и концентрирования определяемых веществ, требует дополнительных затрат времени и реактивов, что увеличивает стоимость анализа.

В данной работе показана возможность количественного определения 73 веществ, относящихся к 13 различным классам ветеринарных препаратов в курином мясе с помощью простой экстракции образца растворителем (без дополнительной очистки и концентрирования) с последующим анализом экстракта методом ВЭЖХ-МС/МС. Высокая чувствительность масс-спектрометра QSight (PerkinElmer) в сочетании с его уникальными технологиями StayClean (десольватация, индуцируемая горячим источником (HSID)), и Laminar Flow Ion Guide (перенос ионов в масс-анализатор с помощью ламинарного потока газа) [20] позволяют проводить анализ экстрактов «напрямую» - без их очистки и концентрирования, что существенно упрощает процедуру анализа, экономит время и деньги.

Экспериментальная часть

Оборудование и программное обеспечение

Хроматографическое разделение проводили на УВЭЖХ PerkinElmer с масс-спектрометрическим детектором QSight 220 (масс-анализатор - тройной квадруполь) с двойным источником ионизации.

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

Реактивы, стандартные растворы и пробоподготовка.

Растворители и реактивы: Метанол (MeOH), ацетонитрил (ACN), диметилсульфоксид (ДМСО), муравьиная кислота, вода класса «для ВЭЖХ-МС» производства Fisher Scientific.

Набор для пробоподготовки согласно АОАС 2007.01 (clean-up kit: MgSO₄ 1200 мг, PSA 400 мг и C18 400 мг) производства PerkinElmer (N9306911).

End-capped C18 Д-ТФЭ (сорбент для дисперсионной твердофазной экстракции) (500 мг C18) производства UCT (Bristol, PA, USA); Z-Sep+ (500 мг/12 мл) производства Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Стандартные образцы: дезэтилен ципрофлоксацин гидрохлорид, гидроксидиметридазол и пирлимицин гидрохлорид производства Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada); галоксон производства Cedarlane Labs (Burlington, ON, Canada); остальные стандартные образцы ветеринарных препаратов производства Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Образцы куриного мяса: были приобретены в продуктовых магазинах города Waterloo (ON, Canada).

Стандартные и калибровочные растворы: исходные растворы индивидуальных компонентов и дейтерированных внутренних стандартов готовили растворением навески стандартного образца в подходящем растворителе (MeOH, ACN, воды или ДМСО), получая растворы с концентрацией 1 мг/мл.

Рабочий раствор внутренних стандартов (IS), содержащий флуниксин-d₃, ¹³C₆-сульфаметазин и ацепромазин-d₃ с концентрацией 10 мкг/мл готовили из аликвот индивидуальных растворов внутренних стандартов, используя в качестве растворителя ацетонитрил.

Базовый раствор β-лактамов и цефалоспоринов с концентрациями компонентов равными 200X (где X = ПДК компонента) готовили из аликвот индивидуальных растворов стандартных образцов, используя в качестве растворителя воду.

Базовый раствор всех остальных определяемых веществ с концентрациями равными 100X (где X = ПДК компонента) готовили из аликвот индивидуальных растворов стандартных образцов, используя в качестве растворителя ацетонитрил.

Рабочий раствор готовили добавкой базовых растворов к испытываемой матрице.

Калибровочные растворы готовились из рабочего раствора и использовались в день приготовления.

Все исходные, базовые и рабочий растворы хранились при температуре -20°C . Срок хранения рабочего раствора 1 неделя. Растворы β -лактамов и цефалоспоринов хранили в пластиковой посуде, растворы остальных определяемых веществ хранили в посуде из темного стекла.

Пробоподготовка:

Образец куриного мяса смешивали с сухим льдом и гомогенизировали до получения порошка, который выдерживали в при -20°C в течение 12 часов для сублимации сухого льда, а затем хранили при -20°C до использования (анализа). Сертифицированные органические образцы куриного мяса (без содержания ветеринарных препаратов) использовали в качестве матрицы для валидации метода.

2,0 грамма образца куриного мяса взвешивали в центрифужной пробирке и добавляли рабочий раствор внутренних стандартов. Калибровочные растворы готовили добавкой соответствующих аликвот рабочих растворов целевых компонентов и внутренних стандартов к сертифицированному образцу куриного мяса. Образец экстрагировали 10 мл смеси ацетонитрил/вода в соотношении 4/1 (по объему). После центрифугирования экстракт сразу анализировали с помощью ВЭЖХ-МС/МС или проводили процедуру его очистки. Очистку экстракта проводили с помощью дисперсионной твердофазной экстракцией (Д-ТФЭ), используя различные сорбенты. Экстракт переносили в пробирку с сорбентом для Д-ТФЭ, перемешивали в течение двух минут, центрифугировали в течение пяти минут при 4°C , после чего, прозрачную надосадочную жидкость анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Хроматографические условия и параметры масс-спектрометра.

Хроматографические условия и параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора представлены в таблице 1. MRM переходы и оптимизированные параметры масс-анализатора для MRM переходов определяемых соединений в порядке их выхода представлены в таблице 2. Для корректной идентификации использовали не менее двух MRM переходов для каждого определяемого соединения [21].

Таблица 1. Хроматографические условия и параметры источника ионизации масс-спектрометрического детектора.

Хроматографические условия	
Хроматографическая колонка	PerkinElmer Brownlee, SPP Phenyl-Hexyl, 100 x 2.1 мм, 2.7 мкм (Cat#N9308485)
Подвижная фаза А	0.1% раствор муравьиной кислоты в воде
Подвижная фаза В	0.1% муравьиная кислота в смеси 90/10 ацетонитрил/метанол
Градиентное элюирование (Скорость потока: 0.4 мл/мин)	3% подвижная фаза В – 1 мин, от 3% до 100% В за 11 мин, 100% В – 2 мин. Время равновесия при переходе на начальные условия 3 мин.
Температура термостата	40°C
Температура образцов в автодозаторе	4°C
Объем инъекции	3.0 мкл
Параметры источника ионизации	
Напряжение ESI +	5000 V
Напряжение ESI -	-4000V
Осушающий газ	120 единиц
Распыляющий газ	200 единиц
Температура источника	400 °C
Температура HSID интерфейса	320 °C

Таблица 2. Параметры MRM переходов определяемых соединений.

Компонент	ESI ±	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	CE ¹	EV ²	CCL2 ³
Флорфеникол амин	+	248.1	230.1	-17	16	-50
		248.1	130.2	-29	16	-50
Гидроксидиметридазол	+	158	140.1	-17	10	-56
		158	112	-25	10	-88
5-Гидроксириабендазол	+	217.7	191.1	-33	46	-36
		217.7	147.1	-43	46	-36
Левамизол	+	205	178	-27	31	-30
		205	91	-49	31	-42
Линкомицин	+	407.2	126.2	-36	18	-56
		407.2	359.1	-24	18	-52
ALBZ 2-аминосульфон	+	240	133.2	-38	25	-63
		240	198	-27	25	-53
Сульфатиазол	+	256.2	156	-19	10	-34
		256.2	108.2	-36	10	-50
Дезэтилен ципрофлоксацин	+	306.1	288	-25	10	-90
		306.1	268	-35	10	-90
Окситетрациклин	+	461.1	426	-24	10	-100
		461.1	201	-50	10	-128

Компонент	ESI ±	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	CE ¹	EV ²	CCL2 ³
Сульфамеразин	+	265.2	108.2	-38	28	-53
		265.2	172.1	-22	28	-37
Тетрациклин	+	445.4	154	-35	19	-96
		445.4	410	-23	19	-44
Энрофлоксацин	+	360.4	316.1	-27	38	-52
		360.4	245.1	-35	38	-47
Сульфаметизол	+	271.2	156	-19	30	-102
		271.2	92.1	-41	30	-69
Орбифлоксацин	+	396.2	295.3	-32	10	-75
		396.2	352.1	-25	10	-40
Сульфаметазин	+	279.2	186	-23	10	-42
		279.2	124.1	-36	10	-44
Сульфаметазин -C13	+	285	124.1	-32	25	-100
		285	186.2	-23	26	-100
Сульфаметоксипиридазин	+	281.2	92.2	-47	10	-68
		281.2	108.2	-35	10	-72
ALBZ сульфоксид	+	282.3	240.1	-19	22	-89
		282.3	208.2	-31	22	-89
Сарафлоксацин	+	386.1	342.2	-26	36	-76
		386.1	299.1	-38	36	-98
Ксилазин	+	221	164	-35	25	-46
		221	90	-29	25	-44
Гидроксипропидазол	+	186	168	-16	26	-24
		186	121.2	-36	26	-20
Кленбутерол	+	276.8	203.2	-20	11	-144
		276.8	132.2	-45	11	-61
Дифлоксацин	+	400.2	356.2	-26	36	-60
		400.2	299.2	-38	36	-92
Морантел	+	221	123.1	-46	28	-74
		221	150.1	-38	28	-68
		221	111	-46	28	-74
6-Фенил-2-тиоурацил	+	205	188	-23	30	-36
		205	146.1	-25	30	-42
Пирлимицин	+	411.1	112.2	-35	28	-92
		411.1	363.1	-23	28	-36
2-Амино-флурбендазол	+	256.1	123.1	-35	48	-60
		256.1	133.2	-50	48	-88
Сульфахлорпиридазин	+	285.2	156.1	-21	25	-95
		285.2	92	-45	25	-62
Клиндамицин	+	425.4	126.2	-38	12	-80
		425.4	377.1	-30	12	-40
Сульфаметоксазол	+	254.1	92.1	-38	30	-60
		254.1	108.3	-39	30	-70
Каразолол	+	299.3	116.2	-25	31	-72
		299.3	222.2	-25	31	-37
Доксициклин	+	445.5	428	-24	16	-68
		445.5	267	-47	16	-112

Компонент	ESI ±	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	CE ¹	EV ²	CCL2 ³
Сульфадоксин	+	311.2	92.2	-49	21	-60
		311.2	108.2	-37	21	-60
Сульфазтоксипиридазин	+	295.2	156	-25	25	-50
		295.2	92.1	-47	25	-66
ALBZ сульфон	+	297.9	159.1	-50	35	-70
		297.9	266.2	-27	35	-39
Оксфендазол	+	315.9	191	-29	36	-90
		315.9	284.1	-25	36	-33
Тилмикозин	+	435.4	174	-31	35	-94
		435.4	99.1	-30	35	-54
		435.4	696	-23	35	-94
Ипронидазол	+	170	109.1	-33	25	-55
		170	123.1	-33	25	-55
Сульфахиноксалин	+	301.3	155.9	-22	30	-48
		301.3	108.1	-38	30	-48
Сульфадиметоксин	+	311.3	156	-27	28	-76
		311.3	92	-48	28	-64
Преднизон	+	359.1	147.1	-40	12	-62
		359.1	171.1	-45	12	-68
Фенбендазол сульфон	+	332.2	300.1	-29	35	-54
		332.2	159.1	-52	35	-94
Галоперидол	+	376.1	165.2	-32	25	-68
		376.1	123.1	-50	25	-86
Ацепромазин	+	327.1	86.1	-25	30	-65
		327.1	222.2	-50	30	-115
		327.1	254	-35	30	-115
Ацетопромазин -диметил-d6	+	333	92.2	-27	20	-70
Прометазин	+	285	86.1	-17	25	-94
		285	198	-33	25	-94
Альбендазол	+	266	234.1	-26	33	-45
		266	191	-44	33	-75
Мебендазол	+	296.5	264.3	-29	30	-110
		296.5	105.1	-52	30	-106
Флубендазол	+	314	282.1	-30	15	-44
		314	123.1	-49	15	-94
Бетаметазон	+	393.3	373.3	-12	15	-48
		393.3	355.2	-18	15	-58
Пропионилпромазин	+	341.1	86.2	-25	25	-52
		341.1	236.2	-50	25	-102
Хлорпромазин	+	319	86.1	-26	25	-60
		319	246.1	-31	25	-135
Оксациллин	+	402.3	160	-27	19	-78
		402.3	243.2	-20	19	-108
Нитроксинил	-	288.8	126.7	32	-24	70
		288.8	162	25	-24	60
Фенбендазол	+	299.9	268.2	-28	34	-64
		299.9	159.1	-47	34	-86

Компонент	ESI ±	Родительский ион (m/z)	Дочерние ионы (m/z)	CE ¹	EV ²	CCL2 ³
Трифлупромазин	+	353	86.2	-27	10	-52
		353	248.1	-55	10	-122
Виргиниамицин	+	526.2	355.2	-23	21	-78
		526.2	337.1	-29	21	-76
Клоксациллин	+	437.3	278.1	-19	17	-116
		437.3	160.1	-25	17	-76
Кетопрофен	+	255	177.1	-26	25	-104
		255	194.1	-33	25	-104
Оксифенилбутазон	+	325.1	204.1	-22	12	-48
		325.1	120.1	-29	12	-44
Нафциллин	+	415.1	199.1	-26	25	-54
		415.1	171.1	-49	25	-78
Диклоксациллин	+	470.3	160	-28	17	-72
		470.3	311.1	-20	17	-126
Флуниксин	+	297	279.2	-29	30	-50
		297	236.2	-55	30	-150
Флуниксин-d3	+	300	282	-29	35	-35
Галоксон	+	415.2	211.1	-46	42	-98
		415.2	353	-29	42	-64
Триклабендазол сульфоксид	+	375	360	-30	25	-72
		375	313	-35	25	-156
Диклофенак	+	296	215	-25	28	-122
		296	250	-15	28	-134
Фенилбутазон	+	309.1	120.1	-25	10	-42
		309.1	188.1	-20	10	-40
Эмабектин	+	886.5	158.2	-48	30	-140
		886.5	302.1	-40	30	-144
Триклабендазол	+	359	344	-34	25	-92
		359	274	-48	25	-96
Оксиклозанид	-	399.8	363.8	24	-10	90
		399.8	201.8	35	-10	70
Никлозамид	-	324.9	170.8	31	-25	60
		324.9	288.9	24	-25	60
Меленгестрол ацетат	+	397.4	337.3	-18	25	-54
		397.4	279.2	-26	25	-62
Тольфенамовая кислота	+	262	244	-22	12	-44
		262	209.1	-37	12	-70
Битионол	-	354.9	160.8	27	-10	60
		354.9	162.8	33	-10	60
Клозантел	-	661.1	315	41	-30	160
		661.1	344.9	47	-30	160

¹ – CE (Collision energy) – энергия соударений.

² – EV (V) – (Entrance Voltage) – входное напряжение на интерфейсе переноса ионов в масс-анализатор.

³ – CCL2 (Collision Cell Lens 2 voltage) – напряжение на входной линзе ячейки столкновений.

Обсуждение результатов

Целевые компоненты и значения ПДК.

В данном исследовании в качестве определяемых компонентов были выбраны 73 ветеринарных препарата (субстанции), относящихся к 13-ти различным классам веществ. Значения ПДК (maximum residue levels (MRLs)) для данных веществ, соответствующие нормативным документам Министерства здравоохранения Канады (Health Canada) и US FDA (U.S. Food and Drug Administration), представлены в таблице 3.

Оптимизация ВЭЖХ-МС/МС метода.

Для подбора оптимальных параметров ВЭЖХ-МС/МС метода использовались различные хроматографические колонки и условия анализа. Наилучшее разрешение компонентов и другие параметры пригодности хроматографической системы были получены при использовании трех колонок: Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.8 мкм, 2.1 × 100 мм), PerkinElmer Brownlee SPP Phenyl-Hexyl (2.7 мкм, 2.1 × 100 мм) и Restek Raptor Biphenyl (2.7 мкм, 2.1 × 100 мм). Также было установлено, что добавка 10% метанола в ацетонитрил (подвижная фаза В) не только улучшает параметры пригодности хроматографической системы, но и увеличивает отклик детектора на определяемые компоненты, особенно для соединений элюирующихся в конце хроматограммы.

Возможность быстрого переключения полярности масс-спектрометра QSight (PerkinElmer) позволяет детектировать как положительные, так и отрицательные ионы в одном аналитическом цикле, что существенно снижает общее время анализа испытуемых образцов.

Матричные эффекты (МЭ).

Матричные эффекты (МЭ) являются одной из основных проблем, с которой сталкиваются аналитики при разработке метода ВЭЖХ-МС/МС метода, особенно это актуально для анализа пищевых продуктов, что объясняется сложностью большинства матриц в этой области. Хорошо известно, что для ионизации методом электроспрей (ESI) характерен эффект подавления ионизации, который обусловлен присутствием в матрице конкурирующих по заряду нецелевых компонентов [22]. Также при ионизации методом электроспрей может наблюдаться эффект усиления ионизации, вызванный присутствием матрицы, что может приводить к значительным ошибкам в количественном определении целевых соединений. Для решения проблемы матричных эффектов обычно используются несколько подходов: разбавление образца, использование внутренних стандартов, калибровка с использованием матрицы, метод добавок, очистка образца в процессе пробоподготовки, применение альтернативных источников ионизации [22-23]. Использование в методе анализа стабильного изотопно-меченного внутреннего стандарта (IS) аналогичного по структуре определяемому соединению, крайне желательно для компенсации МЭ, однако не всегда возможно из-за их низкой доступности и большого числа определяемых компонентов. Наиболее доступными из эффективных способов снижения матричных эффектов являются использование матрицы для построения калибровки или метод добавок.

В данной работе МЭ оценивались путем сравнения значений откликов детектора на определяемый компонент, рассчитанных из калибровочных кривых, полученных для калибровок с использованием матрицы и без нее. Значения матричного эффекта для каждого компонента рассчитывали по изменению (%) откликов детектора, полученных в присутствии матрицы и без нее. Положительное значение матричного эффекта свидетельствует об усилении аналитического сигнала определяемого компонента в присутствии матрицы, а отрицательное значение - об его уменьшении. Как видно из рисунка 1 и таблицы 3, значения МЭ для большинства определяемых соединений (83% определяемых компонентов) были менее 20%. Для остальных 17% определяемых веществ наблюдались значительные МЭ, например, для гидроксидиметридазол и нафциллина значения МЭ составляли 31 и 22.6% соответственно, что свидетельствует об увеличении аналитического сигнала для данных компонентов в присутствии матрицы. Для большинства определяемых соединений с временами удерживания от 3 до 10 минут наблюдался эффект подавления ионизации, что возможно, объясняется не только конкурентными взаимодействиями матрица-аналит, но и совместным элюированием аналитов в смеси [22]. Для компенсации матричных эффектов и увеличения точности

количественного анализа калибровочные кривые с использованием матрицы строились для всех определяемых соединений.

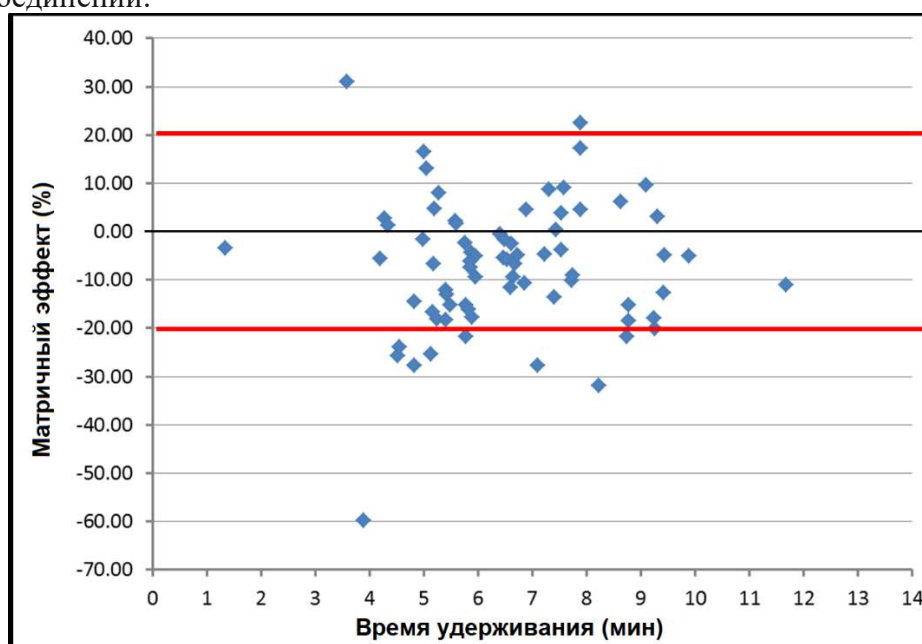


Рисунок 1. Значения матричных эффектов определяемых соединений (%).

Пробоподготовка и степень извлечения.

Процедура пробоподготовки – «слабое звено» мультиклассовых методов (МММs - multiclass, multiresidue methods) для анализа пищевых продуктов. Практически всегда это компромисс между очисткой образца для снижения матричных эффектов и потерей целевых компонентов в процессе очистки (пробоподготовки). Чем больше этапов очистки образца в процедуре пробоподготовки, тем больше потерь и ниже степень извлечения целевых компонентов. Кроме того, растут затраты и суммарное время анализа. С другой стороны, недостаточная очистка образца или ее отсутствие способствует появлению значительных матричных эффектов.

Lehotay SJ и соавторы из департамента сельского хозяйства США (USDA) опубликовали ряд статей о разработке, валидации и сравнении методов МММ для определения ветеринарных препаратов в кормах для животных и пищевой продукции [9-14]. В работе, посвященной анализу бычьей почки [9], авторы проверили и сравнили шесть МММ методов, описанных в литературе, и обнаружили, что ни один из методов не обеспечивал достаточную степень извлечения для некоторых классов определяемых ветеринарных препаратов. При разработке метода авторы установили, что наиболее быстрым и эффективным способом пробоподготовки является экстракция образца смесью ацетонитрила и воды (4/1) и последующая очистка экстракта гексаном и Д-ТФЭ с использованием сорбента С18. Были протестированы и другие типы сорбентов для Д-ТФЭ. Несмотря на то, что некоторые из них обеспечивали лучшую очистку экстракта чем С18, их использование приводило к потере некоторых целевых компонентов. При разработке метода определения более 100 ветеринарных препаратов в мясе крупного рогатого скота [11] Lehotay SJ и соавторы протестировали использование сорбентов Z-Sep и Z-Sep + совместно с С18 и С18 end-capped для очистки с помощью Д-ТФЭ. Наилучший компромисс с точки зрения матричных эффектов и степени извлечения целевых компонентов был получен с использованием гексана и сорбента С18 end-capped. В работах [12-14] авторы отказались от использования гексана на стадии очистки образца, так как это снижало степень извлечения оксифенилбутазона, фенилбутазона и других менее гидрофильных компонентов. В работе [13] был протестирован метод EMR-L («enhanced matrix removal for lipids» - улучшенный метод удаления липидов из матрицы), предназначенный для избирательного удаления липидов и белков из продуктов животного происхождения с высокой жирностью. Результаты показали, что метод EMR-L позволяет получать более чистые экстракты и увеличивает степень извлечения антигельминтиков и транквилизаторов по сравнению с методом Д-ТФЭ с использованием сорбента С18. Однако, для 9-

лактамных антибиотиков и некоторых других полярных препаратов наблюдалась низкая степень извлечения при использовании метода EMR-L. Кроме того, метод EMR-L включает в себя дополнительные этапы обработки экстракта по сравнению с Д-ТФЭ (С18). Для антибиотиков группы тетрациклинов низкая степень извлечения наблюдалась как при использовании метода EMR-L, так и при очистке экстракта с помощью Д-ТФЭ (С18). Для компенсации потерь тетрациклинов в процессе очистки экстракта рекомендуется использовать соответствующие внутренние стандарты [8, 12]. Таким образом, с точки зрения простоты и эффективности метод очистки экстракта с помощью Д-ТФЭ (С18) является оптимальным, однако даже в этом случае только для 75% определяемых соединений степень извлечения лежит в пределах 70-120%, а для остальных препаратов наблюдаются большие потери в процессе очистки водно-ацетонитрильного экстракта [12-14]. Кроме того, ни один из упоминавшихся ранее вариантов очистки не позволяет полностью удалить все полярные компоненты матрицы.

Альтернативными способами снижения матричных эффектов без ощутимых потерь определяемых веществ для мультикомпонентных методов могут служить простое разбавление финального экстракта или снижение объема инжектируемого образца на хроматографическую колонку [11, 12, 14, 22, 23]. Дополнительно данные способы позволяют улучшить хроматографическое разделение компонентов и минимизировать загрязнение системы. Высокая чувствительность современных масс-спектрометрических детекторов позволяет использовать эти простые способы для снижения матричных эффектов и создавать мультикомпонентные методы анализа, включающие определение более 100 препаратов без дополнительной очистки и концентрирования экстрактов [14].

Фильтрация экстракта образца перед его инъекцией является обычной практикой в ВЭЖХ, поэтому для предотвращения его загрязнения материалом фильтра и потерь определяемых компонентов из-за их сорбции на фильтре и необходимо правильно подобрать фильтрующий материал. В работах [9 - 13] авторы проверили четыре различных типа фильтров и установили, что поливинилиденфторидный (PVDF) фильтр дает наилучшие результаты. Тем не менее, фильтрация экстракта приводила не только к частичной потере отдельных компонентов, но и к попаданию в него мешающих анализу веществ из материала фильтра, что приводило к эффекту усиления отклика детектора для некоторых аналитов [9, 12, 14]. В результате, авторы решили полностью отказаться от этапов очистки и фильтрации экстракта и вводить на колонку малый объем образца, а современная высокочувствительная система ВЭЖХ-МС/МС обеспечила требуемые значения ПО и ПКО даже при инъекции малых объемов [14].

В данной работе также было проведено сравнение различных способов пробоподготовки. Оценка степени извлечения проводили, используя образцы куриного мяса с концентрацией определяемых компонентов (образцы с добавкой) равной 0.5X и 1X, где X = ПДК компонента. Степень извлечения компонентов рассчитывали сравнением площадей пиков, полученных при анализе образцов с добавкой и калибровочной кривой, построенной с использованием матрицы. Как видно из таблицы 3, в случаях, когда экстракт анализировался непосредственно без очистки, степень извлечения большинства компонентов варьировалась от 70% до 120% с СКО <20%.

В случае, когда использовалась процедура очистки экстракта с помощью Д-ТФЭ (очистка экстракта проводилась с использованием набора для АОАС 2007.01 (MgSO₄ 1200 мг, PSA 400 мг и С18 400 мг)), для некоторых классов препаратов, например фторхинолонов, тетрациклинов и отдельных транквилизаторов, степень извлечения была существенно меньше, чем для варианта пробоподготовки без очистки экстракта. Аналогичная ситуация наблюдалась и с использованием для Д-ТФЭ сорбента С18 end-capped, что хорошо согласуется с результатами, полученными в работах [8-13]. При использовании для Д-ТФЭ сорбента Z-Sep + получены результаты, аналогичные опубликованным в [11], поэтому в данной работе они не приводятся.

Таблица 3. Значения ПДК, времен удерживания (t_R), матричного эффекта (МЭ), квадрата коэффициента линейной корреляции (R^2) и степени извлечения (СИ) для определяемых компонентов.

Компонент	Фарм группа	ПДК нг/г	t_R , мин	МЭ %	R^2	СИ без Д-ТФЭ, % (СКО,%)	СИ с Д-ТФЭ, % (СКО,%)
Флорфеникол амин	Фениколы	100	1.34	-3.4	0.9999	88 (16)	92 (18)
Гидроксидиметридазол	Кокцидиостатики	50	3.58	31.0	0.9993	90 (10)	103 (11)
5-Гидрокси тиабендазол	Антигельминтики	100	3.89	-59.9	0.9947	111 (13)	92 (17)
Линкомицин	Макролиды / Линкозамиды	100	4.19	-5.6	0.9969	85 (11)	102 (7)
ALBZ 2-аминосульффон	Антигельминтики	100	4.28	2.7	0.9998	108 (8)	87 (11)
Левамизол	Антигельминтики	100	4.34	1.3	0.9989	89 (10)	87 (6)
Дезэтилен ципрофлоксацин	Фторхинолоны	100	4.51	-25.7	0.9988	113 (13)	4 (18)
Сульфатиазол	Сульфаниламиды	100	4.55	-23.8	0.9997	104 (6)	95 (9)
Сульфамеразин	Сульфаниламиды	100	4.82	-27.8	0.9999	110 (4)	98 (8)
Окситетрациклин	Тетрациклины	200	4.82	-14.5	0.9994	99 (12)	11 (15)
ALBZ сульфоксид	Антигельминтики	50	4.99	-1.7	0.9995	71 (4)	69 (9)
Гидроксиипронидазол	Кокцидиостатики	10	5.00	16.6	0.9955	107 (5)	107 (7)
Тетрациклин	Тетрациклины	200	5.05	13.0	0.9963	85 (2)	11 (17)
Энрофлоксацин	Фторхинолоны	20	5.13	-25.5	0.9997	78 (11)	40 (14)
Ксилазин	Транквилизаторы	10	5.14	-13.6	0.9987	121 (9)	92 (11)
Сульфаметазин	Сульфаниламиды	100	5.16	-16.6	0.9990	103 (10)	89 (8)
Сульфаметизол	Сульфаниламиды	100	5.18	-6.6	0.9973	115 (7)	87 (5)
Кленбутерол	β -Агонисты	10	5.19	4.7	0.9994	80 (12)	72 (10)
Орбифлоксацин	Фторхинолоны	50	5.24	-18.1	0.9933	111 (14)	44 (9)
Сульфаметоксипири дазин	Сульфаниламиды	100	5.27	8.0	0.9988	120 (2)	103 (3)
Сарафлоксацин	Фторхинолоны	50	5.40	-12.1	0.9977	117 (4)	45 (6)
Пирлимицин	Макролиды / Линкозамиды	300	5.41	-18.2	0.9994	102 (9)	88 (7)
6-Фенил-2-тиоурацил	Тиреостатики	400	5.41	-12.1	0.9999	117 (4)	93 (10)
Морантел	Антигельминтики	150	5.42	-13.1	1.0000	112 (11)	89 (5)
Дифлоксацин	Фторхинолоны	50	5.48	-15.2	0.9998	106 (8)	90 (12)
2-Амино-флубендазол	Антигельминтики	10	5.59	2.2	0.9977	106 (3)	89 (6)
Клиндамицин	Макролиды / Линкозамиды	100	5.60	1.7	0.9997	99 (8)	87 (11)
Сульфаклорпиридазин	Сульфаниламиды	100	5.76	-2.3	0.9992	109 (7)	103 (3)
ALBZ сульффон	Антигельминтики	50	5.78	-15.3	0.9999	100 (12)	98 (8)
Оксфендазол	Антигельминтики	800	5.78	-21.7	0.9997	95 (14)	83 (9)
Каразолол	Транквилизаторы	10	5.83	-16.1	0.9975	117 (7)	122 (13)
Доксициклин	Тетрациклины	100	5.85	-6.1	0.9931	114 (11)	26 (15)
Сульфаметоксазол	Сульфаниламиды	100	5.86	-7.4	0.9998	110 (2)	92 (4)
Сульфадоксин	Сульфаниламиды	100	5.87	-4.3	1.0000	92 (6)	101 (4)
Тилмикозин	Макролиды / Линкозамиды	100	5.89	-17.7	0.9991	119 (1)	95 (10)
Сульфатокси пиридазин	Сульфаниламиды	100	5.94	-9.5	0.9999	104 (5)	87 (7)
Ипронидазол	Кокцидиостатики	10	5.96	-5.0	0.9965	115 (13)	101 (8)
Сульфадиметоксин	Сульфаниламиды	100	6.41	-0.6	0.9989	94 (4)	89 (10)
Преднизон	Глюкокортико стероиды	100	6.46	-5.4	0.9979	105 (3)	66 (9)
Сульфацинол	Сульфаниламиды	100	6.48	-1.7	0.9997	111 (6)	100 (10)

Компонент	Фарм группа	ПДК нг/г	t _R , мин	МЭ %	R ²	СИ без Д-ТФЭ, % (СКО,%)	СИ с Д-ТФЭ, % (СКО,%)
Альбендазол	Антигельминтики	50	6.53	-5.8	1.0000	100 (3)	93 (7)
Мебендазол	Антигельминтики	10	6.59	-11.5	0.9997	117 (2)	77 (5)
Фенбендазол сульфон	Антигельминтики	400	6.62	-2.6	1.0000	104 (6)	92 (11)
Ацепромазин	Транквилизаторы	10	6.64	-9.4	0.9999	118 (2)	88 (9)
Прометазин	Транквилизаторы	10	6.68	-6.8	0.9890	95 (10)	33 (8)
Галоперидол	Транквилизаторы	10	6.72	-4.8	0.9993	109 (5)	98 (13)
Флубендазол	Антигельминтики	10	6.85	-10.6	0.9989	106 (4)	103 (11)
Бетаметазон	Глюкокортико стероиды	100	6.89	4.5	0.9982	110 (7)	126 (2)
Пропионилпромазин	Транквилизаторы	10	7.10	-27.8	0.9994	121 (5)	85 (8)
Хлорпромазин	Транквилизаторы	10	7.31	8.6	0.9993	92 (3)	68 (7)
Фенбендазол	Антигельминтики	100	7.40	-13.6	0.9999	104 (7)	87 (5)
Оксациллин	β-Лактамы / Цефалоспорины	100	7.43	0.3	0.9998	87 (6)	89 (11)
Трифлупромазин	Транквилизаторы	10	7.53	3.8	0.9993	116 (4)	74 (11)
Флуниксин	НПВС	20	7.54	-3.7	0.9997	114 (3)	90 (10)
Виргиниамицин	Стрептограминный антибиотик	100	7.59	9.1	0.9903	109 (8)	118 (3)
Нитроксинил	Антигельминтики	50	7.72	-10.2	0.9990	84 (10)	71 (7)
Кетопрофен	НПВС	10	7.75	-9.0	0.9964	105 (13)	119 (9)
Нафциллин	β-Лактамы / Цефалоспорины	100	7.88	22.6	0.9998	104 (7)	85 (4)
Клоксацillin	β-Лактамы / Цефалоспорины	100	7.89	4.6	0.9999	103 (2)	96 (12)
Оксифенилбутазон	НПВС	100	7.89	17.3	0.9990	115 (5)	103 (8)
Диклоксацillin	β-Лактамы / Цефалоспорины	100	8.23	-31.9	0.9992	88 (7)	79 (6)
Триклабендазол сульфоксид	Антигельминтики	50	8.63	6.1	0.9989	96 (4)	88 (10)
Галоксон	Антигельминтики	100	8.75	-21.8	0.9998	82 (3)	79 (10)
Эмаектин	Антигельминтики	10	8.77	-15.1	0.9998	105 (12)	76 (19)
Диклофенак	НПВС	200	8.77	-18.5	0.9998	89 (9)	80 (5)
Фенилбутазон	НПВС	100	9.10	9.7	0.9999	117 (3)	90 (5)
Триклабендазол	Антигельминтики	50	9.24	-17.9	0.9988	103 (5)	80 (14)
Меленгестрол ацетат	Ацетилгестагены	25	9.25	-20.0	0.9990	103 (4)	87 (7)
Оксиклозанид	Антигельминтики	10	9.30	3.1	0.9997	111 (6)	78 (11)
Тольфенамовая кислота	НПВС	200	9.42	-12.6	0.9991	88 (9)	67 (10)
Никлозамид	Антигельминтики	10	9.43	-4.8	0.9991	107 (2)	85 (9)
Битионол	Антигельминтики	10	9.90	-5.0	0.9973	87 (4)	59 (8)
Клозантел	Антигельминтики	50	11.68	-11.0	0.9995	93 (6)	86 (5)

Линейность, прецизионность и предел количественного определения.

Калибровочные кривые определяемых компонентов строили как с использованием матрицы (куриное мясо), так и без нее. Концентрации компонентов в калибровочных растворах были равны 0, 0.1X, 0.2X, 0.5X, 1X и 2X, где X = ПДК компонента (см таблицу 3). Все калибровочные кривые определяемых компонентов, построенные как с использованием матрицы, так и без нее, имели хорошую линейность - квадрат коэффициента линейной корреляции (R^2) для всех аналитов был больше 0.99 (см таблицу 3). Типичные примеры калибровочных кривых представлены на рисунках 2 и 3.

Для оценки переноса пробы (carryover) анализировали бланк после калибровочного раствора с концентрацией 2X. Переноса пробы не наблюдалось. Значения СКО (%) количественного определения для всех компонентов были менее 20%, что демонстрирует хорошую прецизионность метода. Установленные значения ПКО (сигнал/шум = 10) для всех компонентов были ниже концентрации равной половине его ПДК (0.5X).

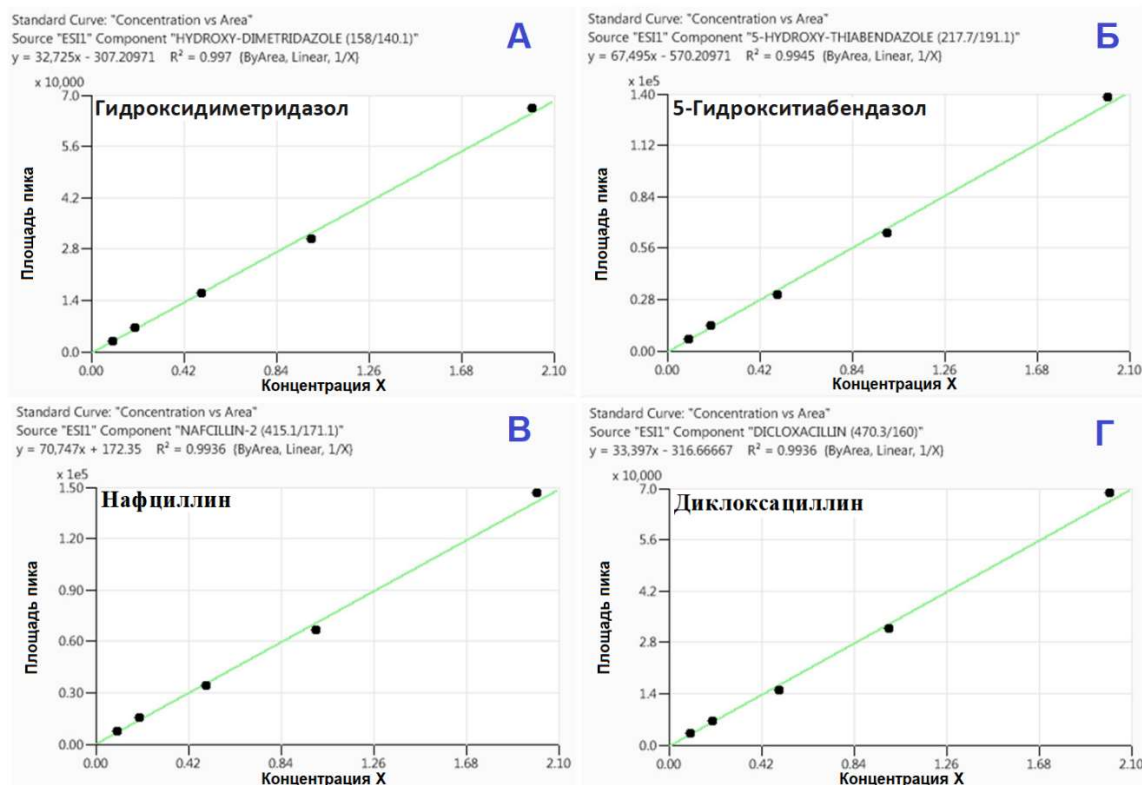


Рисунок 2. Калибровочные кривые Гидроксидиметридазола (А), 5-Гидрокситиабендазола (Б), Нафциллина (В) и Диклоксациллина (Г), построенные без использования матрицы (где X=ПДК компонента).

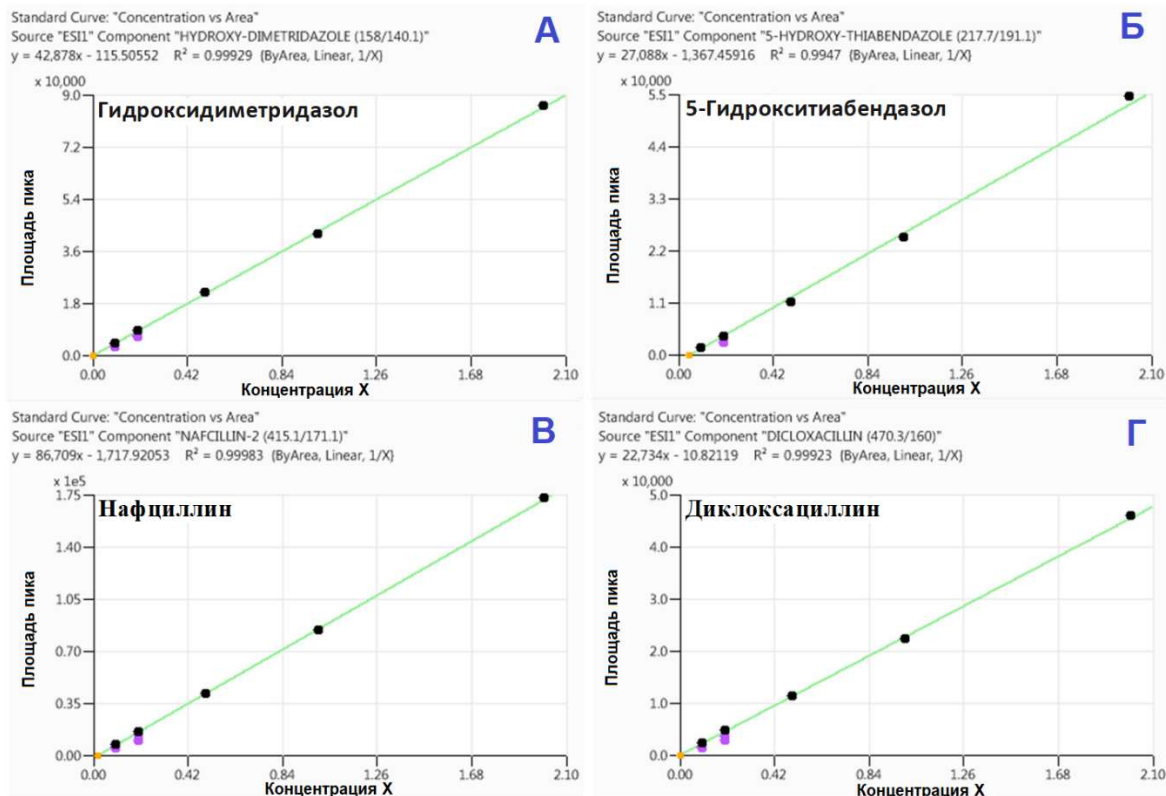


Рисунок 3. Калибровочные кривые Гидроксидиметридазола (А), 5-Гидрокситиабендазола (Б), Нафциллина (В) и Диклоксациллина (Г), построенные с использованием матрицы (где X=ПДК компонента).

Анализ образцов.

Разработанный метод был использован для анализа пяти различных образцов куриного мяса. Ни в одном из исследуемых образцов целевые ветеринарные препараты обнаружены не были.

Заключение

В большинстве случаев пробоподготовка (очистка экстрактов образца) является ключевым моментом при анализе сложных матриц с помощью ВЭЖХ-МС/МС, т. к. позволяет улучшить хроматографическое разделение компонентов и снизить влияние компонентов матрицы на процесс ионизации определяемых соединений (матричные эффекты). Однако в случае мультикомпонентных методов процедура пробоподготовки крайне сложная задача, поскольку в процессе ее проведения часть аналитов может теряться, искажая конечный результат. Необходимо искать компромисс между высокой степенью извлечения определяемых веществ и снижением матричных эффектов. Возможно, совсем скоро благодаря прогрессу в области масс-спектрометрии, метод «разбавь и анализируй» («dilute-n-shot») станет лучшим подходом для разработки высокочувствительных мультикомпонентных методов ВЭЖХ-МС для анализа сложных матриц.

В данном исследовании разработан простой и экономичный мультикомпонентный метод определения ветеринарных препаратов в курином мясе с помощью ВЭЖХ-МС/МС QSight 220 (PerkinElmer). Разработанный метод может быть использован для быстрого скрининга и количественного определения более 70 ветеринарных препаратов в курином мясе, используя принцип разбавь и анализируй. Установленные значения ПКО для всех определяемых веществ значительно ниже ПДК, а отсутствие пробоподготовки обеспечивает их высокую степень извлечения.

Список литературы

- [1] Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. CAC/MRL 2-2017. Updated as at the 40th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2017). <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%252FBMRL%252B2%252FMRL2e.pdf>. Accessed April 13, 2018.
- [2] List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods, Health Canada, August, 2017. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue-limits-mrls-veterinary-drugs-foods.html>. Accessed April 13, 2018.
- [3] Ministry of Agriculture of People's Republic of China Announcement No. 235 Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Animal Derived Foods, 2002. Note: Ministry of Agriculture has completed the revision of «MRLs of Veterinary Drugs in Animal Derived Food», but the newly revised version has not yet been published officially.
- [4] Council Regulation (EC) No 1308/1999 of 15 June 1999 amending Regulation (EC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_1999_1308/reg_1308_1999_en.pdf. Accessed April 13, 2018.
- [5] United States Food and Drug Administration. CFR Title 21 Food and Drugs, Part 556, Tolerances for residues of new animal drugs in food. 2015. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=556>. Accessed April 13, 2018.
- [6] USDA Food Safety and Inspection Service. Chemistry laboratory guidebook. <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooksand-methods/chemistry-laboratory-guidebook>. Accessed April 13, 2018.
- [7] Stubbings, G, Bigwood, T, The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS approach. *Anal. Chim. Acta* 2009, 637, 68–78.
- [8] Dalmia, A. PerkinElmer Application Note (01288), Determination, Confirmation and Quantitation of Multi-Class Antibiotic Residues in Milk by UHPLC MS/MS.
- [9] Lehotay SJ, Lightfield AR, Geis-Asteggiane L, Schneider MJ, Dutko T, Ng C, et al. Development and validation of a streamlined method designed to detect residues of 62 veterinary drugs in bovine kidney using ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2012; 4 (Suppl. 1):75–90.
- [10] Schneider MJ, Lehotay SJ, Lightfield AR. Evaluation of a multiclass, multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of 120 veterinary drugs in bovine kidney. *Drug Test Anal.* 2012;4(Suppl. 1):91–102.
- [11] Geis-Asteggiane L, Lehotay SJ, Lightfield AR, Dutko T, Ng C, Bluhm L. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for > 100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2012; 1258:43–54.

- [12] Schneider MJ, Lehotay SJ, Lightfield AR. Validation of a streamlined multiclass, multi-residue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407:4423–35.
- [13] Anumol T, Lehotay SJ, Stevens J, Zweigenbaum J. Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. *Anal Bioanal Chem.* 2017; 409:2639–53.
- [14] Lehotay SJ, Lightfield AR. Simultaneous analysis of aminoglycosides with other classes of drug residues in bovine tissues by UHPLC-MS/MS using an ion-pairing reagent added to final extracts. *Anal Bioanal Chem.* 2017; 410 (3):1095-1109.
- [15] Lopes, RP, Reyes, RC, Frenich, AG, Multi-residue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 2012, 895-896, 39-47.
- [16] Dasenaki, ME, Thomaidis, NS, Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 2015, 880, 103–121.
- [17] Yin, ZQ, Chai, TT, Mu, PQ, Xu, NN, Song, Y, Wang, X, Jia, Q, Qiu, J, Multi-residue determination of 210 drugs in pork by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1463, 49–59.
- [18] Dasenaki, ME, Michali, CS, Thomaidis, NS. Analysis of 76 veterinary pharmaceuticals from 13 classes including aminoglycosides in bovine muscle by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1452, 67–80.
- [19] Berendsen BJA, Meijer T, Mol HGJ, van Ginkel L, Nielen MWFA. Global inter-laboratory study to assess acquisition modes for multi-compound confirmatory analysis of veterinary drugs using liquid chromatography coupled to triple quadrupole, time of flight and orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2017; 962:60–72.
- [20] PerkinElmer Technical Note (013093-01): QSight StayClean HSID Technology.
[http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TCH_QSight_StayClean_HSID_Technology\(013093_01\).pdf](http://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/TCH_QSight_StayClean_HSID_Technology(013093_01).pdf)
- [21] European Commission, SANCO. 2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed, SANTE/11945/2015 https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf.
- [22] Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, and Alder L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Anal. Chem.* 2012, 84:1474–1482.
- [23] Krynitsky, A. J. Wong, J. W. Zhang K. and Safarpour, H. Focus on Food Analysis: Important considerations regarding matrix effects when developing reliable analytical residue methods using mass spectrometry, *LCGC North America*, 2017, Vol. 35, No. 7, 444-451.

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.