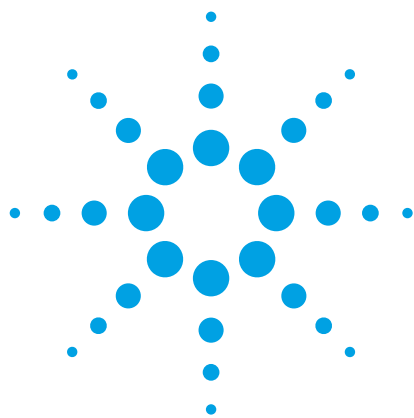




Разработка аналитического метода для одновременного определения остатков амфениколов и сульфонамидов в молоке с использованием метода QuEChERS и анализа с помощью КЭ-МС/МС

Методическая информация

Авторы

Фабиана С. Феликс (Fabiana S. Felix),
Луисио Ангнес (Lúcio Angnes) и
Клаудемир Луисио ду Лаго
(Claudimir Lucio do Lago)
LAIA — Исследовательская группа
по аналитической инструментальной
химии, Университет Сан-Паулу,
Бразилия

Даниэла Даниэл (Daniela Daniel)
Agilent Technologies, Inc.
Бразилия

Резюме

В данном документе описан скоростной аналитический метод одновременного определения остатков амфениколов и сульфонамидов в молоке с использованием метода QuEChERS и анализа с помощью системы капиллярного электрофореза-тандемной масс-спектрометрии (КЭ-МС/МС).



Agilent Technologies

Введение

Неизбирательное применение антибиотиков фермерами для лечения инфекционных болезней у молочных коров, в частности мастита, неблагоприятно влияет на человека, вызывая у него гиперчувствительность, анафилактический шок и дисбаланс кишечной микрофлоры. Прежде всего, это связано с косвенным потреблением этих соединений при употреблении молока и его производных [1]. Национальное агентство наблюдения за здоровьем Бразилии (ANVISA) устанавливает максимально допустимый уровень остатков (МДУ) этих соединений в молоке [2]. Контроль остаточных количеств антибиотиков осуществляется в рамках Национального плана контроля остаточных количеств, проводимого Министерством сельского хозяйства, животноводства и снабжения.

Основной методикой, которая используется для определения ветеринарных препаратов в продуктах питания, является жидкостная хроматография в сочетании с иммунологическими анализами. В данном документе представлен метод одновременного количественного определения хлорамфеникола (CAP), флорфеникола (FF), сульфаметазина (SMZ), сульфадиметоксина (SDM) и сульфатиазола (STZ) в образцах молока с использованием системы капиллярного электрофореза в сочетании с тандемной масс-спектрометрии (КЭ-МС/МС).

Экспериментальная часть

Условия КЭ

Прибор	Система КЭ Agilent 7100
Фоновый электролит	100 мМ NH_4OH , pH 10,8
Подаваемое напряжение	28 кВ
Кварцевая капиллярная колонка	покрытая ПВА, 50 мкм × 85 см (общая длина)
Ввод пробы	30 секунд при давлении 100 мбар
Температура	25 °C

Условия МС

Прибор	Трехквadrупольная система ЖХ-МС Agilent 6430
Ионизация	Электроспреем, регистрация отрицательных ионов
Обволакивающая жидкость	25 мМ NH_4OH /ацетонитрил (50:50 об.), pH 9,0
Скорость потока	4,0 мкл/мин
Напряжение на входе в капилляр	4 500 В
Скорость потока осушающего газа (N_2)	6 л/мин
Температура осушающего газа	250 °C
Распылитель	6 psi

Был разработан метод КЭ-МС/МС для анализа хлорамфеникола, флорфеникола, сульфаметазина, сульфадиметоксина и сульфатиазола с использованием двух переходов для каждого соединения в режиме слежения за множественными реакциями (MRM), как показано в табл. 1.

Таблица 1. Параметры MRM для анализа хлорамфеникола, флорфеникола, сульфаметазина, сульфадиметоксина и сульфатиазола

Определяемое вещество	ВУ (мин)	Переход (m/z)	Энергия диссоциации (эВ)	Время задержки (мс)
Флорфеникол	3,92	356 > 336	4	200
		356 > 185	12	
Хлорамфеникол	4,80	321 > 257	4	200
		321 > 152	8	
Сульфадиметоксин	5,10	309 > 195	4	200
		309 > 66,0	36	
Сульфаметазин	5,30	277 > 122	28	200
		277 > 106	32	
Сульфатиазол	5,60	254 > 156	0	200
		254 > 98	12	

Пробоподготовка

Экстракцию ветеринарных препаратов из молока проводили с использованием метода AOAC QuEChERS. Аликвоту гомогенизированного образца объемом 10 мл поместили в центрифужную пробирку на 50 мл. После перемешивания образца на вортексе в течение 30 секунд в каждую пробирку добавили 10 мл ацетонитрила, используя дозатор. В каждую пробирку добавили содержимое упаковки солей способствующих экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC (каталожный номер 5982-5755). Пробирки с образцами плотно закрыли и энергично встряхивали вручную в течение 1 минуты. Затем их центрифугировали с частотой вращения 4 000 об/мин в течение 5 минут.

Для очистки, 8 мл супернатанта поместили в пробирку Agilent Bond Elut QuEChERS для дисперсионной ТФЭ на 15 мл (каталожный номер 5982-5058). В пробирке содержалось 400 мг реактива с первичными и вторичными аминами (реактив PSA) и 1 200 мг безводного сульфата магния (MgSO_4). Пробирки плотно закрыли и перемешали на вортексе в течение 1 минуты, а затем центрифугировали с частотой вращения 4 000 об/мин в течение 5 минут. Поочередно, 0,5 мл каждого экстракта перенесли во флаконы и разбавили 0,5 мл фонового электролита (1:1 об.). Таким образом образцы были подготовлены к анализу КЭ-МС/МС.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показаны MRM-электрофореграммы, полученные для смеси стандартов хлорамфеникола, флорфеникола, сульфаметазина, сульфадиметоксина и сульфатиазола при концентрации 100,0 мкг/л.

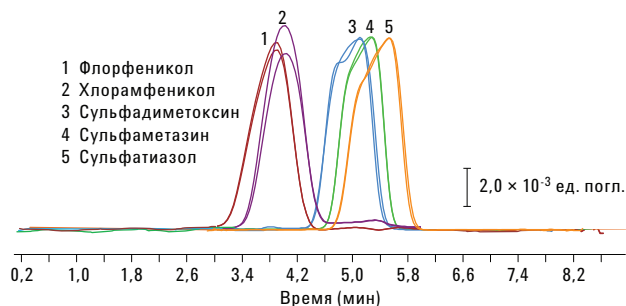


Рисунок 1. Электрофореграммы КЭ-МС/МС при оптимальных параметрах для растворов стандартов хлорамфеникола, флорфеникола, сульфаметазина, сульфадиметоксина и сульфатиазола (с концентрацией 100,0 мкг/л), введенных в экстракт образца молока.

Для определения линейности аналитической кривой использовали соответствующие пробам растворы стандартов антибиотиков с шестью концентрациями в диапазоне от 5,0 до 200,0 мкг/л (млрд д.). Коэффициенты корреляции (R^2) для всех соединений, рассчитанные методом линейной регрессии, превышали 0,99. На рис. 2 и 3 показаны примеры отклика для амфениколов и сульфонамидов в молочном экстракте, полученном по методике QuEChERS.

В табл. 2 сведены линейные диапазоны в экстракте матрицы, пределы обнаружения (ПО), рассчитанные с помощью стандартного отклонения отклика и наклона калибровочной кривой, а также максимально допустимый уровень остатков (МДУ), разрешенные ANVISA [2].

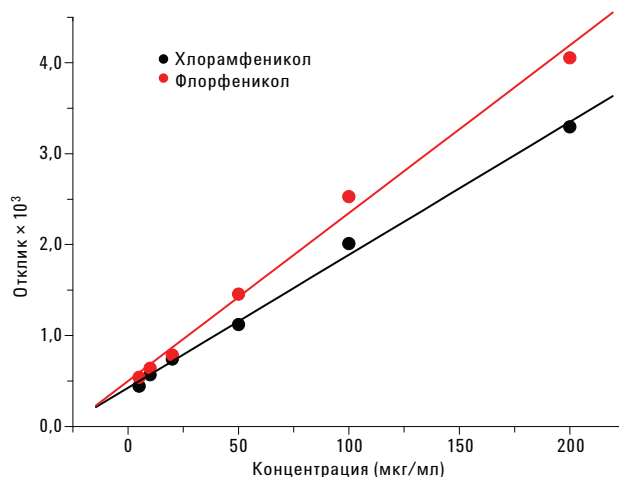


Рисунок 2. Калибровочные кривые для флорфеникола и хлорамфеникола, введенных в экстракт образца молока (диапазон концентраций данных веществ — от 5 до 200,0 мкг/л).

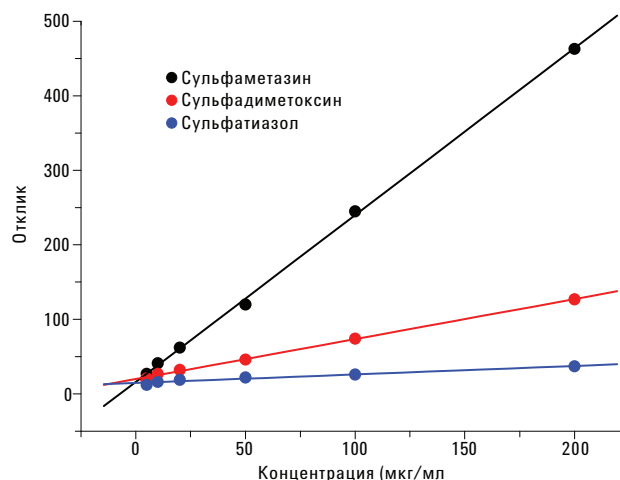


Рисунок 3. Калибровочные кривые для SMZ, SDM и STZ, введенных в экстракт образца молока (диапазон концентраций данных веществ — от 5 до 200,0 мкг/л).

Таблица 2. Линейный диапазон, ПО (мкг/л) и МДУ (мкг/л), рекомендованные ANVISA

Определяемое вещество	Линейный диапазон (мкг/л)	ПО (мкг/мл)	МДУ (мкг/мл)
Флорфеникол	5–200	10,6	н/о*
Хлорамфеникол	5–200	5,7	0
Сульфаметазин	5–200	1,6	100**
Сульфадиметоксин	5–200	8,8	100**
Сульфатиазол	5–200	1,1	100**

* Не определено.

** Сумма всех соединений.

Заключение

Предложенный метод является скоростным (одновременный анализ занимает менее 6,0 минут); он был успешно применен для определения амфениколов и сульфонамидов в образцах молока и молочных продуктов. Благодаря своей чувствительности и специфичности, данный метод прекрасно подходит для установления соответствия предельно допустимых концентраций, установленных в большинстве стран. Предложенная методика является простой, быстрой и дает линейные калибровочные кривые и высокоточные данные при многократном введении проб. Поэтому данный метод представляет собой хорошую альтернативу классическим методам анализа.

Литература

1. M. Castro-Puyana, A.L. Crego, and M.L. Marina
Electrophoresis 2008, **29**, 274 [М. Кастро-Пуяна, А. Л. Кrego и М. Л. Марина, журн. *Электрофорез*, 2008 г., **29**, 274].
2. Национальное агентство наблюдения за здоровьем
Бразилии (ANVISA), сайт: <http://www.anvisa.gov.br>

Дополнительные сведения

Подробнее о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2014.
Издано в США
11 февраля 2014 г.
5991-3847RU



Agilent Technologies