

# Применение автоматизированной системы твердофазной экстракции Fotector Plus от RayKol для пробоподготовки к анализу остаточного содержания семи местных анестетиков в морепродуктах

## Обзор

Использование анестетиков для улучшения выживаемости рыб широко применяется в Китае. В то время как обнаружение анестетиков в морепродуктах по-прежнему не является распространенным явлением ни в Китае, ни за рубежом. В этом исследовании было разработано одновременное определение семи местных анестетиков (бензокаин, лидокаин, тетракаин, цинхокаин, прокаин, прокаинамид, хлоропрокаин) с использованием автоматизированной системы твердофазной экстракции Fotector Plus (Fotector Plus SPE) и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС). Метод показал хорошую линейность в диапазоне 0,1-10 мкг/л для каждого тестируемого анестетика с коэффициентом корреляции более 0,99. Среднее извлечение составило от 73% до 94% при пиковом уровне 1,0 мкг/кг и 5,0 мкг/кг, а относительное стандартное отклонение (RSD) составило от 2,11% до 6,09%. Результаты показали, что этот метод соответствует требованиям по обнаружению местных анестетиков в морепродуктах.

## 1 Вступление

При перевозке рыбы на большие расстояния сильная реакция на стресс может привести к повреждению, включая гибель рыбы, что сказывается на продажах морепродуктов. Чтобы повысить выживаемость рыбы и коммерческие доходы, при транспортировке и в Китае и за рубежом применялись природные и синтетические анестетики.

В настоящее время отечественными и зарубежными исследователями проведено множество исследований механизма обезболивания рыб, направления применения, факторов, влияющих на эффективность препарата, анализа компонентов крови и реакции рыб на стресс. Но исследования безопасности анестетиков,

повторного повреждения анестетиком и риска воздействия остатков анестетика на человека проводятся редко. В последние годы разнообразие и масштабы используемых анестетиков значительно возросли, в связи с повышением спроса на продукты животного происхождения и стремлением к обнаружению анестетиков у человека гораздо сильнее. В этом исследовании предварительное концентрирование воды выполнялось автоматизированной системой твердофазной экстракции Fotector Plus (Fotector Plus SPE) автоматически (включая активацию, загрузку пробы, промывку, элюирование и концентрирование) с меньшими отклонениями по сравнению с ручным управлением, и это развивающееся направление для будущей технологии обнаружения.

## 2 Испытания

### 2.1 Приборы и реагенты

Автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus; высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ); квадрупольный масс-спектрометр (МС/МС); картридж твердофазной экстракции МСХ (вода, 60 мг/3 мл); метанол, муравьиная кислота, гексан и ацетонитрил хроматографического класса (Sigma, США); гидроксид аммония и трихлоруксусная кислота аналитического качества (GuoYao, Шанхай); сверхчистая вода (Merck Millipore Aquelic 5, Германия).

Твердый стандарт анестетика (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов провинции Шаньси), раствор анестетика (смешанные стандарты) в метаноле был исходным раствором в концентрации 100 мг/л и хранился при температуре -20°C.

### 2.2 Технические условия

Условия хроматографии: колонка Fortis Xi C18 (1,7 мкм

× 2,1 мм × 50 мм); температура колонки: 30 °С; подвижная фаза: растворитель А: 0,1% муравьиная кислота в воде, растворитель В: метанол, программа градиентного элюирования приведена в таблице 1; скорость потока: 0,2 мл/мин; объем инъекции: 10 мкл.

Table 1. Программа градиентного элюирования

время/мин	А / %	В / %
0.00	75	25
2.00	75	25
2.01	20	80
6.00	20	80
6.01	75	25
11.0	75	25

Условия масс-спектрометрии: ионизация электрораспылением (ESI), режим положительных ионов, напряжение ионного распыления: 4000 В, температура источника ионов: 350 °С, давление распылителя: 15 фунтов на квадратный дюйм, расход газа: 10 л/мин, время выдержки: 20 мин.

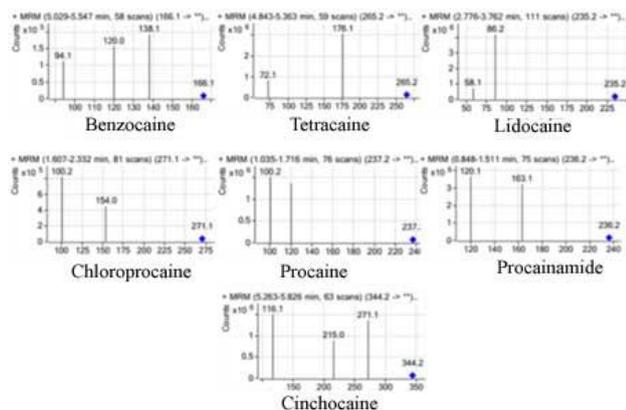


Рис.1. MS/MS график семи местных анестетиков.

### 2.3 Пробоподготовка

2,0 г (точность: 0,01 г) пробы рыбы помещали в центрифужную пробирку, добавляли определенное количество стандарта, перемешивали в течение 1 мин. к смеси добавляли 8 мл трихлоруксусной кислоты и 2 мл ацетонитрила, перемешивали в течение 1 мин, ультразвук в течение 10 мин, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, переносили надосадочную жидкость в разделительную воронку. К надосадочной жидкости добавляли 5 мл гексана, насыщенного ацетонитрилом, и раствор нижнего слоя использовали для дальнейшей очистки.

### 2.4 Очистка

3 мл метанола и 5 мл 1%-ной трихлоруксусной кислоты использовали для активации картриджа ТФЭ МСХ соответственно, после загрузки образца 3 мл 1 %-ной трихлоруксусной кислоты и 3 мл 1 %-ной муравьиной кислоты в метаноле использовали для промывки картриджа без сбора. Для элюирования использовали определенное количество 5%-ного гидроксида аммония в метаноле, элюат собирали, концентрировали и повторно разбавляли 20%-ным метанолом в воде до 1 мл, фильтровали через мембрану 0,22 мкм для анализа ВЭЖХ-МС/МСС.

### Рис. 2. Метод предварительного концентрирования

### 2.5 Предел обнаружения, точность и воспроизводимость

Чтобы избежать влияния подавления ионов субстрата на количественное определение, для приготовления стандартных растворов для построения стандартной кривой использовали чистый образец. Результаты показали хорошую линейность в диапазоне 0,1-10 мкг/л для семи анестетиков, которые могут быть применены в качестве количественного анализа. Добавление стандартного теста на восстановление и прецизионное измерение были обработаны на двух разных уровнях с помощью 4 параллельных операций в соответствии с praf-2.3, и результаты приведены в таблице 2.

Результаты (Таблица 2) показали, что среднее извлечение составляло от 73 % до 94 % при повышенном уровне 1,0 мкг/кг и 5,0 мкг/кг, а относительное стандартное отклонение (RSD) составляло от 2,11 % до 6,09 %, а точность и прецизионность отвечают требованиям анализа остатков. Предел обнаружения для определения 7 остатков анестетика составляет 1 мкг/кг, что может применяться при анализе водных продуктов.

Таблица 2. Восстановление и относительное стандартное отклонение (RSD).

Компонент	Пиковый уровень /мкг.кг-1	Среднее, %	RDS/% (n=4)
Бензокаин	1	77.68	2.38
	5	81.93	5.02
Тетракаин	1	75.52	4.19
	5	76.18	2.11
Лидокаин	1	86.69	5.28
	5	75.66	4.81
Хлоропрокаин	1	76.41	6.09
	5	83.66	5.23
Прокаин	1	80.78	4.31
	5	88.43	3.43
Прокаинамид	1	89.89	4.21
	5	93.60	6.07
Цинхокаин	1	80.04	5.69
	5	73.82	2.45

### 3 Выводы

3.1 Из таблицы 2 следует, что применение автоматизированной системы твердофазной экстракции позволяет извлекать и очищать 7 анестетиков (диапазон концентраций от 1,0 мкг/кг до 5,0 мкг/кг) из морепродуктов с извлечением от 73% до 94% и RSD от 2,11 % до 6,09 %.

3.2 Применение автоматизированной системы твердофазной экстракции позволяет одновременно очищать, предварительно концентрировать образцы и эффективно повышать степень извлечения. Этот метод позволяет сократить количество используемых растворителей, уменьшая ущерб, наносимый органическими растворителями техническому персоналу, сводя к минимуму отклонения, вызванные ручной пробоподготовкой.

3.3 Применение автоматизированной системы твердофазной экстракции позволяет очищать пробы без участия человека, что повышает их применимость; полностью автоматическая работа улучшит параллельность и позволит избежать дифференциации загрузки пробы и расхода при ручной пробоподготовке.