

Определение флоксаценовых антибиотиков в воде

Ключевые слова:

Автоматизированная система твердофазной экстракции; высокоэффективная жидкостная хроматография; тандемная масс-спектрометрия; антибиотики; Fotector Plus; Auto EVA 60

Введение:

Антибиотики хиноны (рис.1) представляют собой новый класс синтетических бактерицидных антибактериальных препаратов с широким антибактериальным спектром действия, сильной антибактериальной активностью, отсутствием перекрестной резистентности с другими антибактериальными препаратами, низкой токсичностью и побочными эффектами. Широко используются для лечения и профилактики болезней водных обитателей и стимулирования их роста. Однако, исследования показывают, что только 20-30% используемых антибиотиков усваивается рыбами, а большая их часть попадает в окружающую среду. Эта часть повторно попадает в пищевую цепь, что может привести к развитию резистентности бактерий у рыб. Это не только влияет на здоровое развитие аквакультур, но и ставит под угрозу безопасность экологии. Хинолоновые антибиотики остаются в воде и попадают в организм человека, что может привести к серьезному нарушению функции печени человека. Поэтому особенно важно разработать методы обнаружения таких антибиотиков в воде. В последнее время методы обнаружения остаточного содержания хинолоновых препаратов в основном включают ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-RF, ВЭЖХ-DAD, ВЭЖХ-МС/МС, а также флуоресцентную спектрометрию, капиллярный электрофорез и иммуноферментный анализ.

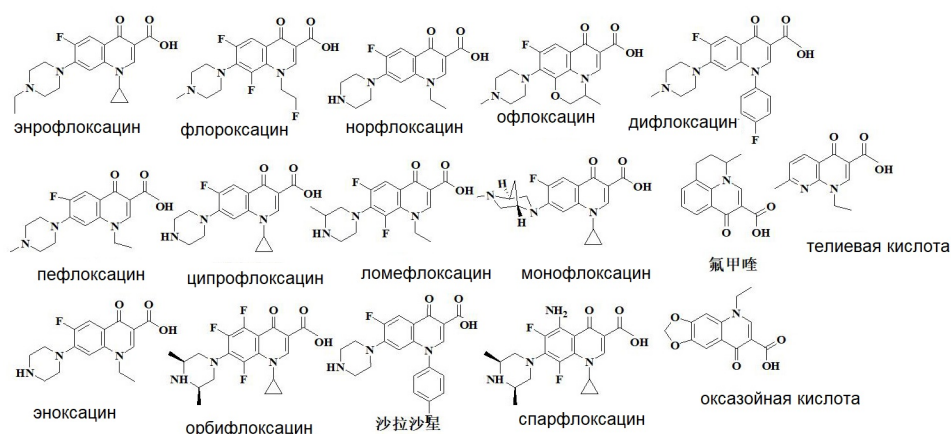


Рис.1 Структурные формулы 16 типов антибиотиков флоксацена.

В данной методике для проведения твердофазной экстракции был выбран картридж МСХ, для анализа использовалась УВЭЖХ-МС/МС. Разработан высокочувствительный метод анализа проб воды. Ожидается, что данный метод будет применяться к анализу проб воды.

1. Оборудование и расходные материалы

Fotector Plus Автоматизированная система твердофазной экстракции от Raykol

Raykol Auto EVA-60 Автоматизированная система упаривания в токе азота

Картридж ТФЭ MCX (RayCureMCX, 200 мг/6мл, RC-204-72857)

ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором

Метанол, ацетонитрил (хроматографическая степень чистоты TEDIA), муравьиная кислота, аммиак (высшая степень чистоты).

2. Пробоподготовка

2.1 рождение ТФЭ

Экстрактор ТФЭ	Fotector Plus Автоматизированная система ТФЭ от RayKol
----------------	--

Картридж ТФЭ	MCX (RayCure, 200 mg/6 mL)
кондиционирование	метанол
Промывка	Водный раствор муравьиной кислоты с pH=4,0.
Элюирование	5% раствор аммиака-метанола

2.2 Очистка образцов

Кондиционируйте картридж ТФЭ метанолом (10 мл) и водой (10 мл) со скоростью 5,0 мл/мин. Отложите в сторону. Возьмите 200 мл образца чистой воды, добавьте стандарт (100 мкл, 100 частей на миллиард), добавьте буферный растворитель ЭДТА-MCIlvaine (50 мл, 0,1 моль/л), чтобы довести pH водной среды до 4, и пропустите со скоростью 5 мл/мин через картридж ТФЭ. Затем используйте 10 мл водного раствора муравьиной кислоты (pH=4,0) для элюирования со скоростью 10 мл/мин, после продувки воздухом используйте 10 мл 5%-ного раствора аммиака и метанола, элюируйте со скоростью 1,0 мл/мин. Элюат упарьте почти досуха при 25°C и давлении 5 psi. Доведите до 1,0мл раствором ацетонитрил-вода (10:90, об./об., 0,1% муравьиной кислоты) для анализа ВЭЖХ-МС/МС.

номер	этап	растворитель	слив	скорость потока (мл/мин)	объем (мл)	время (мин)
1	кондиционирование	MeOH (Methanol)	слив-2	5	10	2.6
2	кондиционирование	pH4.0 Formic Acid/Water	слив-1	10	10	1.6
3	загрузка образца большого объема	sample-1	слив-1	6	200	115.3
4	промывка	pH4.0 Formic Acid/Water	слив-1	5	10	2.6
5	продувка		слив-1	30	20	2
6	элюирование	5%ammonia/MeOH	обор	1	10	10.5
7	продувка			20	5	0.8
8	конец программы					

Рис.2 Схема проведения ТФЭ с помощью Fotector Plus

3. Проведение анализа

3.1 Условия проведения анализа

колонка	Waters XBridge BEH HILIC 2.5мкм ×21 мм × 50мм
скорость потока	0.200 мл/мин
Мобильная фаза	A: 10 mM ammonium acetic (0.1% formic acid) , B: Methanol
Температура колонки	30°C
Объем инъекции	10мкл
Детектор	масс-спектрометрический
режим	ESI ⁺
поток газа	11 л/мин
температура газа	350°C
напряжение	4000
давление	35psi

градиентное элюирование	0,0–1,0 мин, 90 % подвижной фазы А; 1,0–4,0 мин, 50 % подвижной фазы; 50 % подвижной фазы А в течение 2 мин; 6,01–7,01 мин, 90 % подвижной фазы А; 7,01–10,0 мин, 90 % подвижной фазы. фаза А в течение 3 мин.
-------------------------	--

3.2 MRM параметры

Таблица 1. Параметры обнаружения 16 антибиотиков тандемной масс-спектрометрией

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
Эноксацин	321.2	303.2	20	125	20	7
		232.1	20	125	36	7
флороксацин	370.0	370.0	20	135	13	7
		326.2	20	135	25	7
Норфлоксацин	320.2	302.2	20	130	18	7
		233.1	20	130	22	7
Офлоксацин	362.2	318.2	20	140	16	7
		261.1	20	140	26	7
пefлоксацин	334.2	316.2	20	145	18	7
		290.3	20	145	14	7
Ципрофлоксацин	332.2	314.2	20	125	18	7
		231.1	20	125	40	7
ломефлоксацин	352.3	308.2	20	120	14	7
		265.1	20	120	22	7
Денофлоксацин	358.2	340.2	20	135	20	7
		255.1	20	135	42	7
Энрофлоксацин	360.2	342.2	20	135	20	7
		316.2	20	135	16	7
Орбифлоксацин	396.4	396	20	135	21	7
		295.1	20	135	37	7
Сарафлоксацин	386.2	342.2	20	125	18	7
		299.2	20	125	30	7
Дифлоксацин	400.2	356.3	20	135	18	7
		299.1	20	135	30	7
Спарфлоксацин	393.3	349.3	20	150	18	7
		292.2	20	150	26	7
флюмекен	262.1	262.1	20	105	13	7
		244.1	20	105	33	7
щавелевая кислота	262.2	262	20	100	13	7
		244	20	100	29	7
налидиксовая кислота	233.2	233	20	90	9	7
		215.1	20	90	25	7

3.3 Хроматограмма

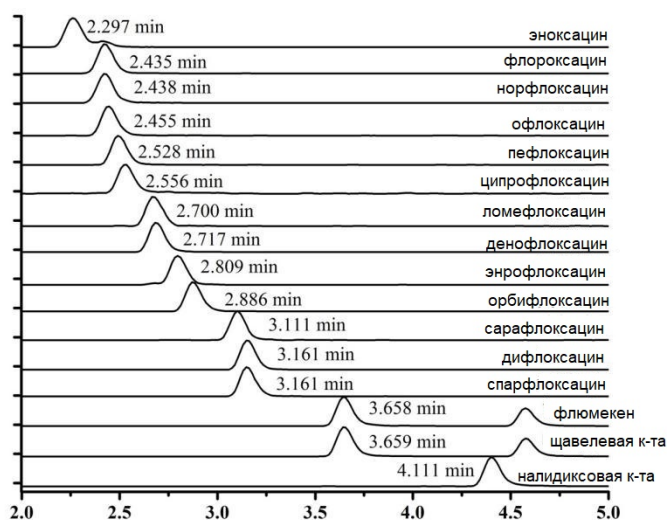


Рисунок 3. Хроматограммы MRM 16 эталонных хинолоновых материалов (5 нг/мл, объем инъекции 10 мкл)

4. проба

4.1 Проверка эффекта матрицы

Возьмите пробу чистой воды, выполните описанные выше этапы обработки пробы, упарьте почти досуха, добавьте стандартный раствор (1 ppm, 20 мкл) и доведите объем до 1 мл для анализа ВЭЖХ/МС-МС. Если концентрация с добавлением матрицы точна, вы можете напрямую использовать стандартную кривую для количественного определения образца; если она неточна, используйте кривую с добавлением матрицы для выполнения количественного анализа в одной точке.

Выберите площадь пика количественного иона по оси ординат, а концентрацию по оси абсцисс и постройте корреляционную кривую. Кривая представляет собой линейную

регрессию с одинаковым весом для каждой точки. Составьте рабочую кривую, требующую $R^2 > 0,99$; эту кривую необходимо перенастраивать раз в две недели.

4.2 Пример тестирования пиковой нагрузки матрицы

Анализ проводился с бутилированной чистой водой и бытовых сточных водах. Стандартные концентрации добавок были низкой (25 нг/л), средней (50 нг/л) и высокой концентрацией (100 нг/л). Результаты представлены в таблице 2. Можно сделать вывод: за исключением энрофлоксацина и спарфлоксацина, которые составляют 76,9–79,4%, большинство показателей извлечения находятся в диапазоне 82,5–114,2%, а среднее стандартное отклонение составляет 1,5–16,6%. Таким образом, данный метод позволяет эффективно обнаруживать в пробах воды 16 хинолоновых антибиотиков.

Таблица 2. Степени извлечения

Compounds	Стандартизированная концентрация бутилированной чистой воды (n=6) Concentration of standard spiked matrix samples (ng/L)						Повышенная концентрация бытовых сточных вод (n=4) Concentration of standard spiked matrix samples (ng/L)					
	25		50		100		25		100			
	Ср. степ. извлеч. (%)	RSD (%)	Ср. степ. извлеч. (%)	RSD (%)	Ср. степ. извлеч. (%)	RSD (%)	Ср. степ. извлеч. (%)	RSD (%)	Ср. степ. извлеч. (%)	RSD (%)		
Эноксацин	109.0	10.3	95.5	7.5	107.6	6.4	99.0	10.3	86.7	9.7		
флороксацин	102.5	12.9	104.0	3.0	114.3	4.6	92.5	12.9	94.9	14.6		
Норфлоксацин	114.2	12.6	100.0	6.3	112.4	2.0	104.2	12.6	99.7	11.1		
Офлоксацин	107.7	6.1	102.8	4.0	114.2	4.0	107.7	6.1	100.3	6.4		
пефлоксацин	110.9	6.0	91.3	8.5	114.1	1.5	100.9	6.0	97.3	13.3		
Ципрофлоксацин	104.7	7.4	100.7	6.4	104.1	2.4	104.7	7.4	89.2	16.6		
лемефлоксацин	104.2	7.4	107.5	7.3	109.7	7.3	104.2	7.4	107.9	15.4		
Денофлоксацин	107.7	14.9	101.1	6.5	114.7	3.8	107.7	14.9	90.9	12.4		
Энрофлоксацин	99.6	9.0	77.4	7.3	110.3	9.8	79.6	9.0	95.0	5.1		

Орбифлоксацин	93.5	10.3	97.5	8.0	106.0	8.2	93.5	10.3	95.8	2.5
Сарафлоксацин	100.2	7.4	113.2	4.4	96.4	6.6	100.2	7.4	84.5	4.0
Дифлоксацин	97.9	12.0	94.7	6.0	111.9	9.8	97.9	12.0	90.0	9.3
Спарфлоксацин	76.9	8.4	95.2	4.2	88.6	14.4	76.9	8.4	84.3	1.8
флюмекен	99.6	10.4	105.7	6.0	102.2	5.6	99.6	10.4	82.5	3.0
щавелевая кислота	99.6	10.4	103.2	7.4	99.7	9.4	99.6	10.4	83.2	3.7
налидиксовая кислота	110.9	6.6	99.9	6.5	99.3	7.1	110.9	6.6	86.5	2.8

4.3 Использование различных типов картриджей ТФЭ для извлечения соединения флоксацина

В качестве образца берут чистую воду, стандартная массовая концентрация составляет 50 нг/л. Согласно вышеуказанному методу, измеряют 4 параллельных образца для проверки скорости извлечения и воспроизводимости различных картриджей ТФЭ этого метода. Результаты анализа показаны на рисунке 4. Показано: Средняя скорость восстановления антибиотиков в чистой воде распределяется между 65,00–91,38% (HLB), 71,21–152,28% (MAX) и 77,41–123,21% (MCX).

Степень извлечения ГЛБ, как правило, низкая, степень извлечения флоксацина в картридже MAX высокая, а пefлоксацина и офлоксацина превышает 140%, а при использовании картриджа MAX необходимо добавлять гидроксид натрия в пробу воды, что легко вызывает гидролиз и осаждение ионов металлов в пробах воды, что может легко вызвать засорение капилляров системы. Напротив, картридж MCX имеет лучший параллелизм, чем картриджи HLB и MAX, а степень извлечения в основном составляет от 90% до 110%, за исключением энрофлоксацина, у которого низкая степень извлечения - всего 77,41%.

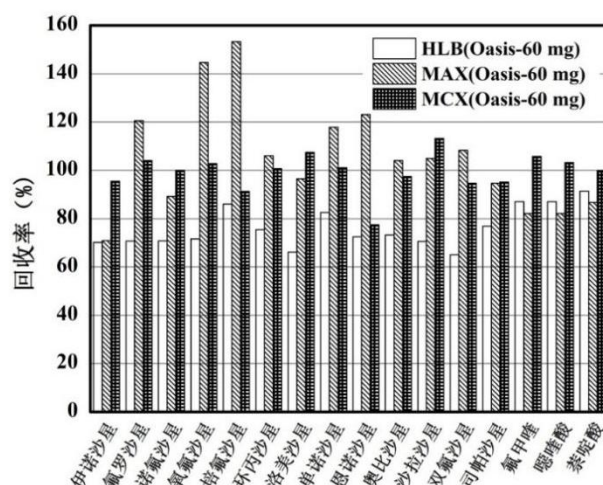


Рисунок 4. Сравнение степени извлечения трех типов картриджей

5. Результаты и обсуждение

5.1 Для данного метода определения 16 флаксеноидных соединений в воде следует учитывать влияние матрицы. Помехи на этом этапе возникают не только из-за взаимодействия примесей в пробе воды, но и из-за возможных мешающих примесей в картриджах ТФЭ (используйте только от проверенных производителей), используемых растворов хроматографического качества и т. д. Поэтому необходимо подтвердить матричный эффект.

5.2 В процессе упаривания продувкой азотом следует не допускать чрезмерного высыхания.

5.3 Что касается амфотерных соединений, таких как флоксацин, то при pH=7,0 или около того они в основном существуют в водном растворе в отрицательно заряженной форме и поэтому не могут быть адсорбированы картриджем ТФЭ. Поэтому необходимо довести pH примерно до 4,0,

чтобы он стал положительным ионом с радикалами аммония, что удобно для следующего этапа обогащения катионообменной колонки.

6.4 Использование подкисленного муравьиной кислотой водного раствора во время элюирования может помочь удалить остаточную ЭДТА в картридже для твердофазной экстракции и предотвратить ее влияние на обнаружение соединений флоксацина в последующих элюатах.

6. Преимущества методики

Высокопроизводительная автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus от RayKol обрабатывает 6 образцов одновременно и 60 образцов за одну партию в автоматическом режиме. Все основные этапы: активация, загрузка, промывка и элюирование полностью автоматизированы, что значительно повышает эффективность прибора. Обеспечивает высокую степень извлечения целевых компонентов. Автоматизированная система упаривания в токе азота AutoEVA-60 автоматически выполняет быстрое и параллельное концентрирование образцов небольшого объема.



Автоматизированная система твердофазной экстракции серии Fotector от RayKol



Автоматизированная система упаривания в токе азота серии EVA от RayKol



**Ведущий поставщик решений для автоматизированной
подготовки проб**