



Определение остатков агонистов $\alpha 2$ -рецепторов в свинине и курятине

Агонисты $\alpha 2$ -рецепторов действуют на симпатические нервные окончания периферической и центральной нервной систем, снижают высвобождение норадреналина, могут оказывать седативный, анксиолитический, антисимпатический и некоторый анальгезирующий эффект. Среди этих препаратов тизанидин-релаксант скелетных мышц, в основном используется в клинической практике при болезненных мышечных спазмах. Ксилазин оказывает седативное, обезболивающее и миорелаксирующее действие. Он в основном применяется для седации и обезболивания животных, таких как лошади, крупный рогатый скот, овцы, собаки, кошки и олени, что удобно в случае дальних перевозок и проведении болезненных манипуляций. Бримонидин — препарат, клинически применяемый у пациентов с открытоугольной глаукомой и высоким внутриглазным давлением, для снижения внутриглазного давления лучший эффект достигается при его применении в комбинации с блокаторами β -рецепторов. Апраклонидин оказывает сильное влияние на $\alpha 2$ -адренорецепторы и снижает внутриглазное давление за счет активации $\alpha 2$ -адренорецепторов в глазу. Клонидин - старый антигипертензивный препарат, который в настоящее время редко применяют. Клонидин может угнетать ЦНС и снижать артериальное давление. Большие дозы могут привести к шоку, замедлению сердечного ритма и смерти от дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности.

Эта статья описывает метод предварительной обработки проб с использованием смешанной катионообменной колонки и высокочувствительного определения тизанидина, ксилазина, бримонидина, апраклонидина и клонидина в свинине и курятине методом ВЭЖХ-МС/МС в соответствии с «GB 31660.6-2019 Определение остатков 5 агонистов $\alpha 2$ -рецепторов в продуктах животного происхождения». Стандартные показатели извлечения превышали 80%.

Оборудование и расходные материалы

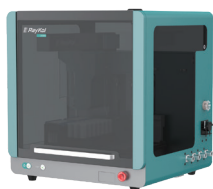
Оборудование	AP 300 Автоматическая рабочая станция для обработки жидких проб
	Raykol Fotector Plus – высокопроизводительный автоматический прибор для твердофазной экстракции
	Высокопроизводительный вакуумный параллельный концентратор серии Raykol MPE
	Raykol Auto EVA 80 Высокопроизводительный автоматический параллельный концентратор
Расходные материалы	ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС)
	Смешанная катионообменная колонка RayCure MCX, 60мг/3мл, кат.№ RC-204-72855

Приготовление растворов

раствор карбоната натрия	Возьмите 10,6 г безводного карбоната натрия, растворите в воде и разбавьте до 100 мл
Раствор натрия бикарбоната	Возьмите 8,4 г бикарбоната натрия, растворите в воде и разбавьте до 100 мл
Буферный раствор карбоната натрия	Возьмите 90 мл раствора карбоната натрия и 10 мл раствора бикарбоната натрия, хорошо перемешайте, используйте свежеприготовленным
Р-р муравьиной кислоты (0,2 %)	Растворите 1 мл муравьиной кислоты в воде и доведите до 500 мл.
Раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле	К 80 мл 0,2% раствора муравьиной кислоты добавить 20 мл ацетонитрила, хорошо перемешать.
Р-р аммиака в метаноле (5%)	Возьмите 5 мл аммиачной воды, растворите ее в метаноле и доведите до 100 мл.

Построение калибровочного графика

Из исходного стандартного раствора с концентрацией 1,0 мкг/мл с помощью автоматической станции обработки жидких образцов AP 300 были приготовлены стандартные растворы с концентрациями 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 и 20,0 мкг/л, затем их экстрагировали после уравнивания при комнатной температуре и снимали рабочие кривые.

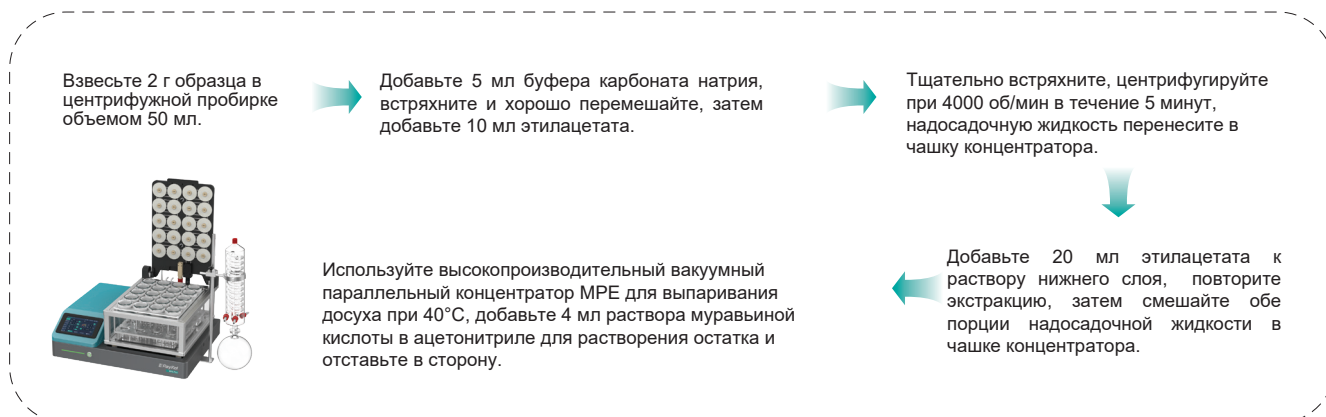


Полностью автоматическая рабочая станция для обработки жидких проб

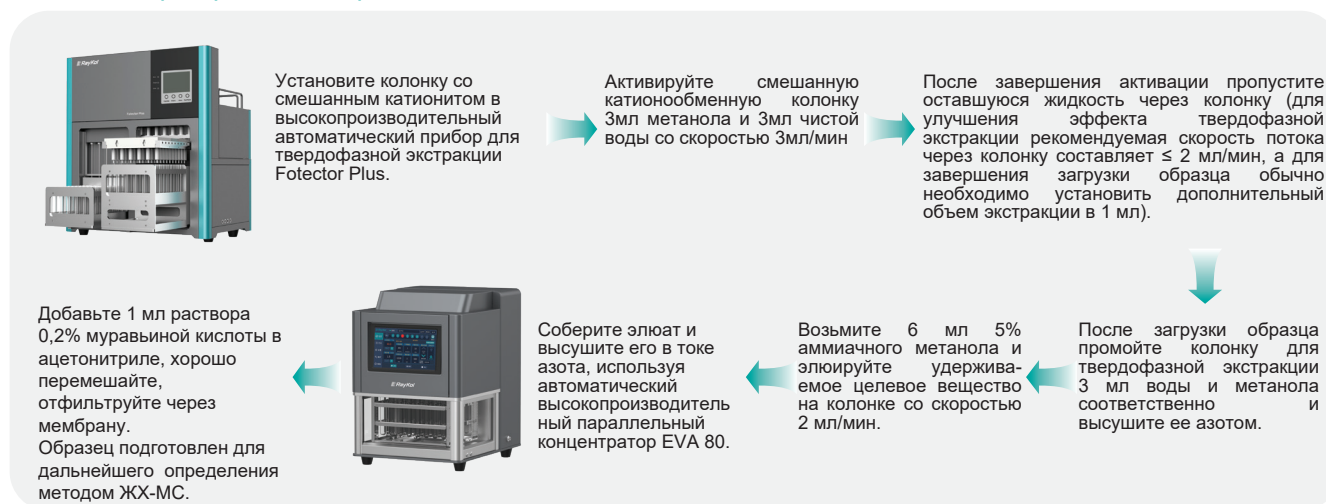
序号	命令	源液位	源液浓度	源液体积/mL	目标位	目标浓度	目标体积/mL	溶剂	洗针溶剂
1	填充管路	A1	1000.00	1.00	A11	100.00	3.00	甲醇-乙腈	
2	直接稀释	A11	100.00	1.00	A12	10.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
3	直接稀释	A12	10.00	1.00	A41	1.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
4	直接稀释	A12	10.00	1.00	A42	2.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
5	直接稀释	A12	10.00	1.00	A43	5.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
6	直接稀释	A12	10.00	1.00	A44	10.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
7	直接稀释	A11	100.00	1.00	A44	10.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
8	直接稀释	A11	100.00	1.00	A45	20.00	1.00	甲醇-乙腈	甲醇-乙腈
9	方法结束								

Обработка образцов

Предварительная обработка образцов свинины и курятины



Очистка твердофазной экстракцией



Условия проведения твердофазной экстракции

Экстрактор	Fotector Plus
Колонка для ТФЭ	Смешанная катионообменная колонка (60мг/3мл)
Активация	Метанол, чистая вода
Промывка	Чистая вода, метанол
Элюирование	5% аммиачный метанол

Операция	Растворитель	Выход	Скорость потока мл/мин	Объем, мл	Время, мин.
Очистка каналов для образцов	CH ₃ OH				2.8
Активация	CH ₃ OH	Органич. отходы	2	3	1.9
Активация	H ₂ O	Сточн. воды	2	3	1.9
Загрузка образца		Органич. отходы	1	5	5.6
Промывка	H ₂ O	Сточн. воды	3	3	1.4
Промывка	CH ₃ OH	Органич. отходы	3	3	1.4
Осушивание					15
Элюирование	5% аммиачный метанол	Собрать	2	6	3.5
Выдержка					2
Продувка		Собрать	10	5	1.1
Окончание					

Условия ВЭЖХ

Колонка	Колонка C18 (напр. Waters , 100 мм x 2,1 мм x 1,7 мкм)
Скорость потока	0.300 мл/мин
Подвижная фаза	A: раствор ацетата аммония и 0,1% муравьиной кислоты, B: ацетонитрил
Температура колонки	35°C
Объем инъекции	2мкл
Детектор	масс-спектрометрический
Режим ионизации	ESI+
Температура ионного источника	150°C
Напряжение	4000
Давление газ-распылителя	35psi
Градиент	0 мин ацетонитрил 7%, 0-2,0 мин ацетонитрил 7%, 4,0-5,0 мин ацетонитрил 70%, 5,5-8,0 мин ацетонитрил 7%

Рис. 1 Метод твердофазной экстракции с помощью Fotector Plus

Результаты и обсуждение

Для проверки степени извлечения этого метода, в свинину и курятину были добавлены стандарты с концентрацией 1,0 мкг/кг, 2,0 мкг/кг и 5,0 мкг/ (n=3). Результаты показаны в Таблице-1: степень извлечения целевого соединения была в пределах 80-120%, а значение RSD варьировалось в пределах 15%. Это показывает, что данный метод может быть хорошо применен для определения пяти агонистов $\alpha 2$ -рецепторов в организме свиньи или курицы.

Таблица 1. Извлечение обогащенных целевых соединений и значения RSD для образцов свинины и куриного мяса.

Образец	Проект	Диапазон лин. коррел. кривой (нг/мл)	Коэфф. коррел. R ²	Пик. уровень (мкг/кг)	Отн. станд. откл. (%)	Средн.коэфф. извл. (%)
Свинина	Тизанидин	1.0~20	≥0.99	1	6.51	97.5
				2	6.69	95.8
				5	1.83	99.2
	Ксилазин	1.0~20	≥0.99	1	6.27	96
				2	6.76	99.3
				5	1.88	101
	Бримо-нидин	1.0~20	≥0.99	1	6.32	99
				2	7.86	97
				5	1.71	100.2
	Апракло-нидин	1.0~20	≥0.99	1	5.91	97.5
				2	6.95	96.5
				5	1.83	99.9
	Клонидин	1.0~20	≥0.99	1	9.14	98.5
				2	4.15	101.5
				5	4.18	103.3
Куриное мясо	Тизанидин	1.0~20	≥0.99	1	8.59	95.5
				2	2.01	97.5
				5	4.43	103
	Ксилазин	1.0~20	≥0.99	1	8.89	96
				2	1.61	100
				5	2.69	103
	Бримо-нидин	1.0~20	≥0.99	1	8.13	98
				2	2.2	99.8
				5	4.24	105.7
	Апракло-нидин	1.0~20	≥0.99	1	9.52	92.5
				2	1.7	98.3
				5	3.4	101.9
	Клонидин	1.0~20	≥0.99	1	10.59	98
				2	3.57	100.5
				5	4.5	103.8

Резюме

- Данное приложение относится к методу GB 31660.6-2019 Определение остатков пяти альфа2-агонистов в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС).
- Raykol AP 300 - это полностью автоматизированная рабочая станция для обработки жидких проб, которая позволяет готовить стандартные растворы с различными концентрациями, добавлять пробы и дозировать жидкие образцы.
- Вакуумный параллельный концентратор Raykol MPE обеспечивает большое удобство при обработке проб: большие объемы проб концентрируются в вакууме при встряхивании на водяной бане, что позволяет сократить время концентрирования и получить более стабильные результаты концентрации.
- Высокопроизводительный автоматический твердофазный экстрактор от Raykol Fotector Plus автоматизирует процесс очистки образца, начиная от активации и до загрузки образца и элюирования за один шаг. За день можно обработать до 180 образцов, что делает процесс твердофазной экстракции эффективным и удобным. Fotector Plus может использоваться совместно с высокопроизводительным автоматическим параллельным концентратором Raykol Auto EVA 80, причем их штативы для образцов совместимы, что устраняет необходимость переноса образцов и позволяет работать последовательно и легко, избегая потери образцов.