

# Применение автоматизированной системы твердофазной экстракции Fotector Plus от RayKol для пробоподготовки к анализу остаточного содержания хлорамфениколов в продуктах питания животного происхождения

## Аннотация

Одновременное определение хлорамфеникола (ХФ), флорфеникола (ФФ) и тиамфеникола (ТАФ) в свинине и рыбе проводили методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС/МС). Образцы гомогенизировали, экстрагировали ацетонитрилом, концентрировали после удаления жира и очищали с помощью автоматизированной системы твердофазной экстракции RayKol Fotector Plus на картридже с силикагелем.

ВЭЖХ/МС/МС анализ проводился с ионизацией электрораспылением (ESI) в режиме отрицательных ионов, мониторинга множественных реакций (MRM). При уровне добавления стандарта от 0,1 до 5,0 мкг/кг извлечение ХФ и ФФ составило 84,95 % - 97,95 % и 72,57 % - 91,7 %, соответственно. При уровне добавления стандарта от 1 до 5,0 мкг/кг, извлечение ТАФ составило от 69,93% до 91,75% с RSD от 4,2 до 12,3 (n=4). Точность и прецизионность данного метода соответствуют требованиям анализа следовых количеств антибиотиков.

## 1 Введение

Хлорамфениколы - это антибиотики широкого спектра действия, которые широко используются в качестве лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний домашней птицы. В связи с серьезными побочными эффектами и токсическим действием хлорамфениколов на организм человека, такие страны, как США, Япония, Корея, Европейский Союз и др. запретили использование добавление хлорамфениколов в корма сельскохозяйственных животных, предназначенных для получения продуктов питания. По современным нормативным документам содержание хлорамфениколов в продуктах животного происхождения не допускается (должно быть менее 10 мкг/кг).

Для определения остатков хлорамфениколов в пищевых продуктах используются методы ВЭЖХ/МС и ГХ/МС.

В соответствии с методом GB/T22338-2008, для очистки образцов использовалась автоматизированная система твердофазной экстракции RayKol Fotector Plus, на которой проводилась очистка и концентрирование образцов в автоматическом режиме, что значительно повышало эффективность работы. Процедура пробоподготовки для определения ХФ, ФФ и ТАФ в свинине и рыбе методом ВЭЖХ/МС достаточно проста и не требует дериватизации, в отличие от анализа методом газовой хроматографии.

## 2 Эксперимент

### 2.1 Реактивы и оборудование

Ацетон (чистый для хроматографии от Sigma), н-гексан (чистый для хроматографии от Sigma), ацетонитрил (чистый для хроматографии от Sigma); картридж для твердофазной экстракции с силикагелем (Agilent Bond Elut SI, 5 00мг/3мл); безводный сульфат натрия (чда, Sinopharm Chemical Reagent Co, Ltd); стандарты хлорамфеникола (ХФ), флорфеникола (ФФ) и тиамфеникола (ТАФ) (Sigma, США); вышеуказанные стандарты растворяли в метаноле для получения исходного раствора смешанного стандарта в концентрации 1 мг/мл и хранили при -20°C.

Автоматизированная система твердофазной экстракции RayKol Fotector Plus; жидкостный тандемный хроматомасс-спектрометр (ВЭЖХ-МС/МС) с ионизацией электроспреем; колонка Agilent EC-C18(2. 7 мкм × 3,0 × 50 мм); гомогенизатор (FLUKO, FA25), центрифуга (H-2050R), роторный испаритель (IKA@RV10 basic, IKA@NB10 basic); вихревая мешалка (IKA@MS3 basic).

## 2.2 Параметры оборудования

### 2.2.1 Условия хроматографирования

Подвижная фаза: Метанол/вода (40:60, объемн.); скорость потока: 0,2 мл/мин; температура колонки: 30 °С; объем инъекции: 10 мкл.

### 2.2.2 Условия масс-спектрометрии

Электрораспылительная ионизация (ESI), мониторинг множественных реакций (MRM) и режим отрицательных ионов, напряжение распыления ионов: 4000 В; температура источника ионов: 350 °С; давление распылителя: 15 psi; скорость потока газа: 10 л/мин.

## 2.3 Предварительная обработка образцов

### 2.3.1 Выделение хлорамфеникола из образца

5,00 г образца взвесили с точностью 0,01 г и добавили около 5 г безводного сульфата натрия и 20 мл ацетонитрила. Образец гомогенизировали в течение 1 мин, затем промыли нож гомогенизатора 20 мкл ацетонитрила. Образец центрифугировали в течение 5 мин при 5500 об/мин, перенесли супернатант в сепарационную воронку и добавили 15 мл ацетонитрила и н-гексана. Дополнительно добавили 20 мл ацетонитрила к остатку, встряхивали в течение 3 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 5500 об/мин. Затем надосадочную жидкость перенесли в сепарационную воронку и встряхивали в течение 5 мин. После расслоения раствора нижний слой ацетонитрила перенесли в бутылку для образцов, добавили 5 мл изопропанола и высушили на ротационном испарителе. Наконец, добавили 5 мл ацетона/н-гексана (1:9) перемешали в вортексе, перенесли во флакон для проб и очистили с помощью колонки.

### 2.3.2 Очистка образца с помощью колонки для твердофазной экстракции

Картридж для твердофазной экстракции (фаза силикагель) активировали 10 мл ацетона/н-гексана (1:9) при скорости 20 мл/мин. Далее экстракт растворяли в 5 мл ацетона/н-гексана (1:9) и наносили образец при скорости 1 мл/мин. После этого промывали 2 мл ацетона/н-гексана (1:9) и элюировали 5 мл ацетона/н-гексана (6:4). Полученный элюент был сконцентрирован и высушен при 40 °С под током азота (давление 10 psi). Окончательно, полученный остаток растворяли в 1 мл метанола/воды (30:70).

Программа работы оборудования показана ниже (рис. 1).

№	Команда	Р-тель	Выход	Скорость	Объем	Время
1.	Промывка линии пробы	СЗН60-С6Н14 (1:9)	Емкость 1	60	5	0,1
2.	Промывка шприца	СЗН60-С6Н14 (1:9)		60	2	0
3.	Кондиционирование	СЗН60-С6Н14 (1:9)	Емкость 1	20	10	0,5
4.	Загрузка образца		Емкость 1	1	5	5
5.	Промывка виал	СЗН60-С6Н14 (1:9)	Емкость 1	60	2	0
6.	Ополаскивание	СЗН60-С6Н14 (1:9)	Емкость 1	2	2	1
7.	Промывка шприца	СЗН60-С6Н14 (1:9)		20	3	0,2
8.	Элюирование	СЗН60-С6Н14 (1:9)	Емкость 1	1	5	5
9.	Окончание					

Рисунок 1. Программа твердофазной экстракции для Fotector Plus.

## 2.4 Степень извлечения и точность метода

Чтобы устранить влияние матрицы на количественное определение, необходимо провести серию измерений смешанных стандартов в присутствии экстрактов чистых образцов. Добавляли смесь стандартных растворов (ХФ, ФФ и ТАФ) в 5 г чистого образца свинины и рыбы в концентрациях 0,1, 1,0 и 5,0 мкг/кг соответственно, для проверки точности извлечения. В таблице 1 показаны показатели извлечения и прецизионности. При тестировании 3 вариантов концентраций стандартов в холостых пробах, степень извлечения в различных матрицах составила от 69 % до 98 % при RSD < 15 %, что соответствует требованиям анализа следовых концентраций. Для ТАФ на уровне пика стандарта 0,1 мкг/кг, ТАФ не был обнаружен, что может быть связано с большой интерференцией матриц и относительно низкой чувствительностью оборудования. На рисунке 2 показаны результаты измерений MRM холостых проб с добавлением стандарта.

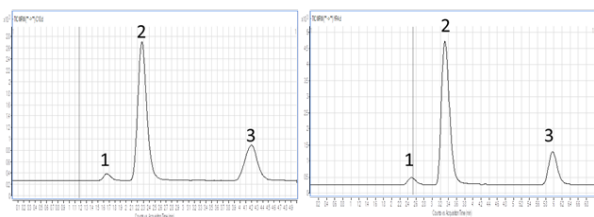


Рисунок 2. Результаты анализа в режиме MRM для ХФ (1, 2,52 мин), ФФ (2, 3,342 мин) и ТАФ (3, 6,03 мин) в стандартном тесте со свиной (слева) и рыбой (справа).

	5.0	85.01	5.9	75.54	8.5
ТАФ	0.1	-	-	-	-
	1.0	91.75	10.9	69.93	8.4
	5.0	84.57	6.8	80.03	7.5

### 3 Выводы

Влияние сложных матриц, таких, как ткани животных затрудняют определение остатков лекарственных препаратов в образце. В нашем методе образцы экстрагировали ацетонитрилом, очищали с помощью Fotector Plus на картридже с силикагелем и определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. Этот метод не требует добавления внутренних стандартов, что снижает затраты. Результаты, полученные в данной работе, объективны, а сам метод применим практически. Таким образом, данный метод может быть использован для анализа остаточного содержания хлорамфениколов в тканях животных.

Таблица 1. Средние показатели извлечения и прецизионности хлорамфениколов в различных матрицах.

Соединение	Концентрация матричного раствора мкг/кг	Образец свинины		Образец рыбы	
		Степень извлечения	RSD (n=4)	Степень извлечения	RSD (n=4)
		%	%	%	%
ХФ	0.1	84.95	10.1	88.30	11.3
	1.0	97.95	4.2	87.18	8.3
	5.0	92.37	5.1	88.34	6.2
ФФ	0.1	74.80	12.3	91.70	7.8
	1.0	83.42	4.6	72.57	5.9