

Применение автоматизированной системы твердофазной экстракции RayKol Fotector Plus (Fotector Plus SPE) для анализа сульфаниламидов в свинине

Аннотация

В соответствии с "Постановлением Министерства сельского хозяйства КНР № 1025 - 23-2008 о нормировании следовых количеств сульфаниламидов в продуктах животного происхождения", был разработан метод анализа сульфаниламидов в свинине на основе автоматизированной системы твердофазной экстракции Fotector Plus (Fotector Plus SPE) с последующим ВЭЖХ-МС анализом. Образцы экстрагировали уксусным эфиром, а затем соляной кислотой. Очистку образцов проводили с помощью системы Fotector Plus SPE с катионообменным ТФЭ картриджем. Анализ и количественное определение выполняли методом высокоэффективной жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием метода внешнего стандарта. Средний уровень извлечения составил от 70 % до 102 % при относительном стандартном отклонении (RSD) < 6 % (n= 4).

1 Введение

Сульфаниламиды (СА) - это синтетические противомикробные препараты, содержащие сульфаниламидную группу, которые могут использоваться для профилактики и лечения бактериальных инфекционных заболеваний. Существуют тысячи СА, и десятки из них широко используются. В организме человека СА в основном метаболизируются и инактивируются печенью, затем превращаются в ацетилированные метаболиты и выводятся с мочой. Образование осадка в моче, обусловленное низкой растворимостью вышеуказанных соединений может привести к повреждению мочевыводящих путей, а также вызвать гематурию, кристаллурию и повреждение почек. В последние годы правительства всех стран мира усиливают контроль и выявление остатков сульфаниламидных препаратов в продуктах питания животного происхождения.

2 Эксперимент

2.1 Оборудование и реактивы

Оборудование: Автоматическая система твердофазной экстракции RayKol Fotector Plus (Fotector Plus SPE), картридж для твердофазной экстракции Waters MCX (Waters, 60 мг/3мл); жидкостный тандемный хромато-масс-спектрометр (ВЭЖХ-МС) с ионизацией электроспреем; устройство для сушки азотом.

Реактивы: Уксусный эфир, н-гексан, метанол, ацетонитрил хроматографического класса (TEDIA); муравьиная кислота, соляная кислота и аммиак. *Стандартные образцы:*

Сульфаметоксазол, сульфаметизол, сульфапиридин, сульфахлорпиридазин, сульфамеразин, сульфадиметоксипиримидин, сульфонометоксин, сульфаметоксидиазин, сульфаметазин, сульфизомидин, N-сульфанилилацетамид, сульфадиметизоксазол, сульфадимоксин.

Чистота > 99%.

Концентрация исходного раствора 1000 мг/л в метаноле для дальнейшего использования.

2.2 Пробоподготовка

5 г гомогенизированной свинины поместили в 50 мл центрифужную пробирку, добавили 15 мл уксусного эфира и перемешивали в вортексе в течение 2 мин, затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин. Смесь перенесли во флакон для отбора проб, пропустив через слой безводного сульфата натрия. Такая же процедура экстракции была проведена с остатком центрифугирования. Затем к экстракту добавили 5 мл 0,1 М соляной кислоты и удалили уксусный эфир при 45 °С. Слой соляной кислоты перенесли в центрифужную пробирку объемом 10 мл. Пробирку промыли 2 мл 0,1 М соляной кислоты и затем объединили растворы. К раствору добавили 5 мл н-гексана, взболтали и центрифугировали в течение 5 мин при 3500 об/мин .

Н-гексан отбросили и повторили процедуру, используя 3 мл н-гексана, а затем весь слой соляной кислоты перенесли в чистую бутылку для отбора проб. 3 мл 0,1 М соляной кислоты использовали для промывки центрифуги дважды, и промывочный раствор также поместили в бутылку для отбора проб. Установили колонку MCX на Fotector Plus и провели процедуру твердофазной экстракции и очистки, как показано на рисунке 1.

№	Команда	Р-тель	Выход	Скорость	Объем	Время
1.	Промывка линии пробы	СНЗОН	Емкость 1	20	5	0,3
2.	Промывка шприца	СНЗОН		20	2	0,1
3.	Кондиционирование	СНЗОН	Емкость 1	1	2	2
4.	Кондиционирование	HCL	Емкость 2	1	2	2
5.	Загрузка образца		Емкость 2	1	10	10
6.	Промывка виал	HCL	Емкость 2	60	2	0
7.	Ополаскивание	HCL	Емкость 2	1	2	2
8.	Ополаскивание	Rine	Емкость 2	1	2	2
9.	Продувка воздухом		Емкость 2	20	5	0,3
10.	Сушка					5
11.	Промывка шприца	Elute		20	2	0,1
12.	Элюирование	Elute	Емкость 1	0,5	2	4
13.	Окончание					

Рисунок 1. ТФЭ с помощью Fotector Plus.

Примечание: растворителем второго промывания была смесь (вода: метанол : ацетонитрил = 55:25:20, объемн.), а элюирования - смесь (вода: метанол : ацетонитрил : аммиак = 75:10:10:5, объемн.).

Таблица 1. Степень извлечения добавленных стандартов (%).

Соединение	1	2	3	4	Avg	RSD
Сульфаметоксазол	74.7	70.8	79.5	79.8	76.20	5.63
Сульфаметизол	71.2	86.3	74.6	83.3	78.85	9.02
Сульфапиридин	72.4	73.4	82.7	83.2	77.93	7.47
Сульфаклорпиридазин	76.1	75	79.5	87.1	79.43	6.88
Сульфамеразин	72.5	78.7	78.3	86	78.88	7.01
Сульфадиметоксипиримидин	80.6	77.4	86.2	91.3	83.88	7.32
Сульфамонотоксин	77.3	79.7	73.4	88.5	79.73	8.03
Сульфаметоксидиазин	76.9	72.7	69.9	86.5	76.50	9.49
Сульфаметазин	80.3	87.1	80.3	97.6	86.33	9.47
Сульфизомидин	71.6	71.7	67.8	72.8	70.98	3.08
N-сульфанилацетамид	102.5	109.4	105	91.7	102.1	7.37
сульфадиметизоксазол	99.4	89.2	94.2	81.9	91.18	8.18
сульфадимоксин	80.1	87.1	84.2	93.9	86.33	6.73

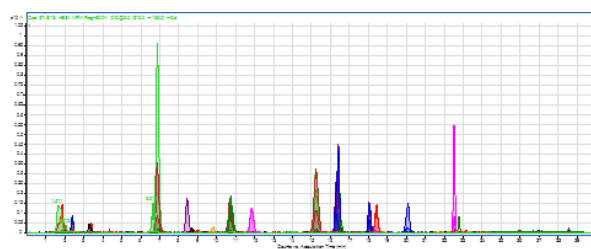


Рисунок 2. MRM диаграмма 13 стандартов сульфаниламидов (20 мкг/л).

2.3 Предел обнаружения, точность и степень извлечения

После добавления стандарта в количестве 4 мкг/кг, образцы были предварительно обработаны и очищены с помощью Fotector Plus, при этом средний показатель извлечения составил от 60% до 110% с RSD < 6% (n=4), что соответствует требованиям к экстракции. На рисунке 2 показана диаграмма MRM для стандартов сульфаниламидов, а в таблице 1 приведены данные по показателям извлечения.

3 Заключение

3.1 При использовании Fotector Plus SPE для экстракции сульфаниламидов из образцов свинины, степень извлечения составила от 70% до 102%, что показывает, что Fotector Plus SPE оказывает лишь незначительное влияние на результаты обработки проб.

3.2 Раствор, полученный при обработке эфиром уксусной кислоты, необходимо пропустить через слой безводного сульфата натрия перед тем, как поместить его в бутылку для проб RayKol. Иначе при экстракции н-гексаном может образоваться желеобразный слой, и вызвать затруднения при разделении водной фазы и н-гексана.

3.3 Применение Fotector Plus SPE позволяет провести всю процедуру твердофазной экстракции, включая активацию, загрузку образца, очистку пробоотборника и элюирование.

3.4 Применение Fotector Plus SPE позволяет проводить твердофазную экстракцию полностью в автоматическом режиме, исключая ошибки, связанные с работой персонала и изменениями условий процесса, и, тем самым, показывает лучшую воспроизводимость.