



Определение остатков мегестрола ацетата/медроксипрогестерона ацетата в свином мясе и печени

Мегестрола ацетат (Мегестрол) относится к производным 17 α -гидроксипрогестерона и является высокоэффективным синтетическим гестагеном. Этот продукт имеет очевидный антиэстрогенный эффект. Использование, отсутствие эстрогенной или андрогенной активности, отсутствие анаболического эффекта. Он может ингибировать высвобождение гипоталамического гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) и воздействовать на гипофиз, снижая его чувствительность к ГнРГ, тем самым блокируя высвобождение гипофизарного гонадотропина и вызывая значительный ингибирующий эффект на овуляцию. Медроксипрогестерона 17-ацетат в основном используется для лечения дисменореи, функциональной аменореи, функционального маточного кровотечения, угрозы выкидыша или привычного выкидыша, эндометриоза, лечения распространенного рака молочной железы, аденокарциномы эндометрия и рака почки. Более высокие дозы можно использовать в качестве противозачаточных инъекций длительного действия.

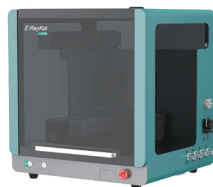
Эти указания по применению относятся к методу, изложенному в «GB 31660.4-2019 Определение остатков ацетата мегестрола и ацетата медроксипрогестерона в продуктах животного происхождения», с использованием очистки на смешанном катионообменном картридже, комбинированной технологии высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Разработан высокочувствительный метод анализа предварительной обработки и обнаружения мегестрола ацетата/медроксипрогестерона ацетата в свиной и свиной печени, а уровень извлечения при добавлении двух веществ был в пределах 70 % выше, что указывает на то, что метод может точно и эффективно обнаруживать два прогестагена в свинине и свиной печени.

Оборудование, расходные материалы и реагенты

Оборудование	Raykol Fotector Plus Автоматизированная система для твердофазной экстракции
	RayKol Auto EVA 80 Высокопроизводительный автоматический упариватель
	Raykol MPE Высокопроизводительный вакуумный концентратор
	Raykol AP Автоматическая рабочая станция для обработки жидких проб
Расходные материалы	Смешанный катионообменный картридж (RayCure MCX, ВЭЖХ 60mg/3mL, Кат. номер : RC-204-72855)
	ВЭЖХ
Реактивы	Ацетонитрил (для ВЭЖХ), муравьиная кислота (для ВЭЖХ)
	Буферный раствор ацетата аммония 0,2 моль/л: возьмите 15,4 г ацетата аммония, добавьте 900 мл воды для растворения, Используйте уксусную кислоту, чтобы довести значение pH до 5,2, добавить воду, чтобы разбавить до 1000mL
	80% раствор ацетонитрила

Построение калибровочной кривой

Возьмите исходный раствор смешанного стандарта 1,0 мкг/мл и исходный раствор смешанного внутреннего стандарта 0,1 мкг/мл и используйте полностью автоматическую рабочую станцию для обработки жидких проб AP 300, чтобы подготовить концентрации 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 и 20,0 мкг /л после уравнивания при комнатной температуре.

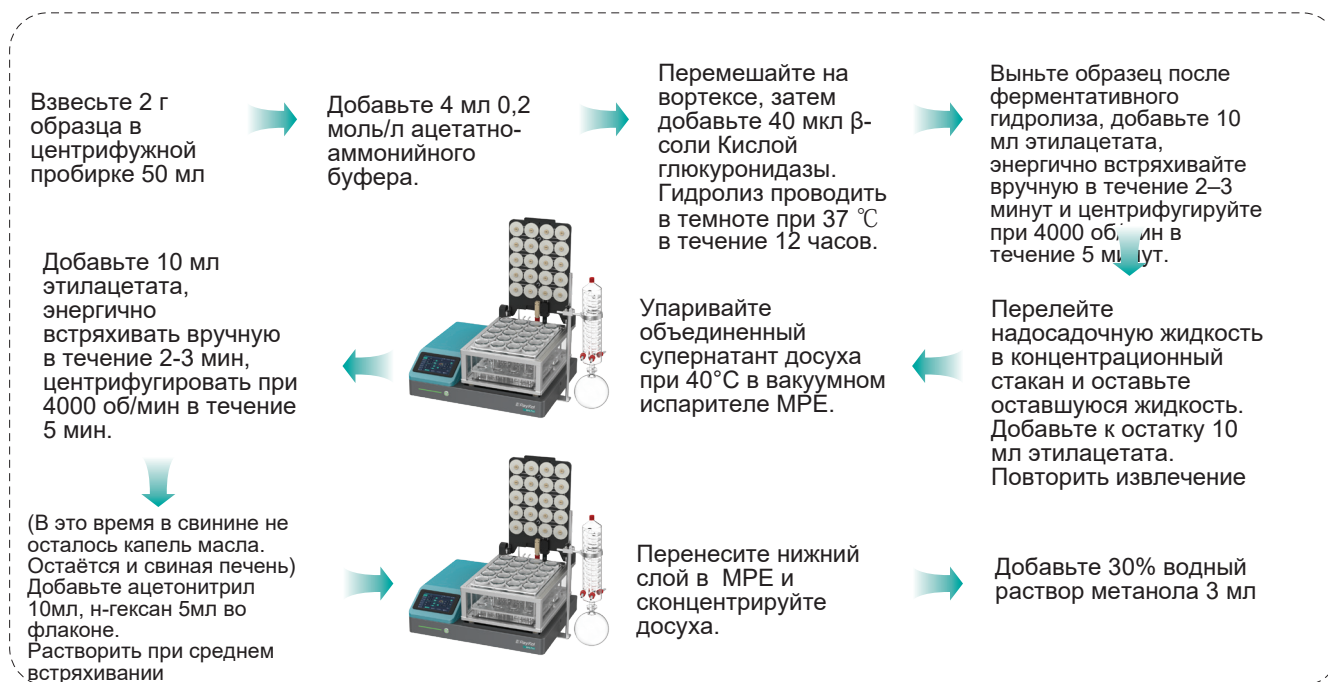


Полностью автоматическая рабочая станция для обработки жидких проб

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						3.00	80%乙醇水	
2	直接稀释	A1	1000.00	1.00	A21	100.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
3	直接稀释	A21	100.00	1.00	A22	10.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
4	内标曲线	A22	10.00	1.00	A41	1.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
5	内标曲线	A22	10.00	1.00	A42	2.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
6	内标曲线	A21	100.00	1.00	A43	5.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
7	内标曲线	A21	100.00	1.00	A44	10.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
8	内标曲线	A21	100.00	1.00	A45	20.00	1.00	80%乙醇水	80%乙醇水
9	方法结束								

Этапы анализа

Пробоподготовка образцов свиной печени и свинины



Условия ТФЭ

Оборудование	Fotector Plus
картридж ТФЭ	смешанная катионообменная колонка (60 мг/3 мл)
Промывка	Чистая вода, 50% раствор метанола
Элюирование	Метанол

Очистка твердофазной экстракцией

Установите смешанный катионообменный картридж в Fotector Plus, активируйте по 3 мл метанола и чистой воды со скоростью 3 мл/мин. После завершения активации возьмите резервный раствор и пропустите его через картридж (чтобы обеспечить лучшее проведение твердофазной экстракции, рекомендуется, чтобы скорость колонки составляла ≤ 2 мл/мин, а для завершения загрузки образца обычно следует устанавливать дополнительный объем экстракции 1 мл). После загрузки картридж промывают водой и 50% раствором метанола соответственно. Продувают азотом, отбирают 5 мл метанола и элюируют оставшееся в картридже целевое вещество со скоростью 2 мл/мин. Собирают элюат, переносят в упариватель EVA 80. После упаривания добавляют 1 мл 80% раствора ацетонитрила, перемешивают на вортексе и после фильтрации анализируют на ВЭЖХ-МС.

Условия жидкостной хроматографии

Колонка	C18 (Waters, 100 мм×2,1 мм×1,7 мкм)
скорость потока	0,300 мл/мин
Мобильная фаза	A: Раствор ацетата аммония (содержащий 0,1% муравьиной кислоты), B: Ацетонитрил.
Температура колонки	35°С
Объем впрыска	2 мкл
Детектор	масс-спектрометрический
Режим ионизации	ESI+
продувочный газ	11л/мин
Температура азота	350°С
Напряжение	4000
Давление распыления	35 psi
градиентное элюирование	0 мин ацетонитрил 50 %, 0–1,0 мин ацетонитрил 50 %, 3,0–5,0 мин ацетонитрил 50 %, 5,5–8,0 мин ацетонитрил 50 %

Этап	Растворитель	Слив	Скорость потока (мл/мин)	Объем (мл)	время (мин)
Промывка	CH ₃ OH				2.8
активация	CH ₃ OH	орг. отходы	3	3	1.4
активация	H ₂ O	орг. отходы	3	3	1.4
Загрузка образца		орг. отходы	1	4	4.5
Промывка	H ₂ O	Сбор	3	3	1.4
Промывка	CH ₃ OH:H ₂ O=1:1	орг. отходы	3	3	1.4
Сушка					3
Элюирование	CH ₃ OH	Сбор	2	5	2.9
Пауза					2
Продувка		Сбор	5	5	1.6
Завершение					

Рисунок 1. Метод очистки твердофазной экстракцией двух прогестинов

Результаты и обсуждение

Чтобы проверить степень извлечения этого метода, когда к свинине (n=3) добавлялись 1,0 мкг/кг, 2,0 мкг/кг и 4,0 мкг/кг, данные показаны в Таблице 1: степень извлечения при добавлении все целевые соединения находятся в пределах 70-110%, значение RSD контролируется в пределах 10%. Это показывает, что этот метод может быть хорошо применен для обнаружения ацетата мегестрола/ацетата медроксипрогестерона в свинине и печени.

Таблица 1. Показатели восстановления при добавлении и значения RSD свинины и печени

Объект анализа	Соединение	Диапазон линейной корреляции кривой (нг/мл)	Коэфф. корр. R ²	содержание (мкг/кг)	СКО (%)	Среднее (%)
свинина	медроксипрогестерона ацетат	1.0ng/mL~20ng/mL	≥0.99	1	3.7	77.8
				2	5.67	98.3
				4	9.97	92.5
	мегестрола ацетат	1.0ng/mL~20ng/mL	≥0.99	1	6.55	80.3
				2	2.24	94.3
				4	3.84	89.5
Свиная печень	медроксипрогестерона ацетат	1.0ng/mL~20ng/mL	≥0.99	1	3.68	84.5
				2	2.96	90.1
				4	3.8	90
	мегестрола ацетат	1.0ng/mL~20ng/mL	≥0.99	1	3.46	88
				2	4.54	99.8
				4	2.4	77.8

Итоги

- В решении, предложенном в этой статье, используется технология высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) для обнаружения и установления высокочувствительной предварительной обработки ацетата мегестрола/ацетата медроксипрогестерона в свинине и печени, а также методы обнаружения и анализа.
- Конфигурация стандартной кривой использует полностью автоматическую рабочую станцию для обработки жидких проб AP 300 от RayKol, которая может реализовывать такие функции обработки жидких проб, как подготовка стандартного смешивания, подготовка стандартной кривой, добавление пробы и разделение жидкости. Весь процесс не требует присутствия персонала. Запрограммированная работа прибора позволяет эффективно избежать человеческих ошибок, обеспечивая точность кривой.
- Вакуумный параллельный упариватель MPE обеспечивает большое удобство в процессе подготовки проб. Объем пробы большого объема концентрируется эффективно, время концентрации короче, а эффект концентрации более определен за счет встряхивания в вакууме и на водяной бане.
- В этом методе используется высокопроизводительный автоматизированный прибор для твердофазной экстракции Fotector Plus, от активации до загрузки образца и элюирования за один этап; он может обрабатывать до 180 образцов в день. Штативы для образцов совместимы с высокопроизводительным полностью автоматическим параллельным упаривателем в токе азота Auto EVA 80, что устраняет необходимость в переносе образцов, делает работу последовательной и простой, а также позволяет избежать потерь пробы при переносе.