

Определение остаточного содержания амантадина в пищевых продуктах животного происхождения



Амантадин — самый ранний противовирусный препарат, применявшийся для ингибирования вируса гриппа, его получают реакцией с мочевиной после бромирования адамантана. Этот препарат стимулирует высвобождение дофамина из нервных окончаний и снижает обратный захват дофамина пресинаптическими нейронами. Побочные действия - тошнота, психозы (мании, галлюцинации, возбуждение, делирий), судороги, могут привести к серьезным системным изменениям. Этот препарат обладает легкой кардиотоксичностью, его легкие побочные реакции аналогичны побочным реакциям на антихолинергические препараты: головокружение, сухость во рту, бессонница, вялость и сыпь.

Существует множество действующих стандартов на определение амантадина, например, "SN/T 4253-2015 Остатки противовирусных препаратов в экспортируемых тканях животных". Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия с количественным определением" и "GB 31660.5-2019 Национальный стандарт безопасности пищевых продуктов Определение остатков амантадина в продуктах животного происхождения методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии" Настоящие стандарты распространяется на обнаружение остатков амантадина в тканях (мышцы, печень и почки) свиней, кур и уток, а также яйца домашней птицы.

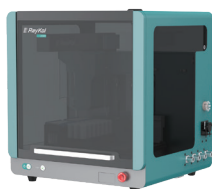
Данный документ описывает процедуру предварительной обработки образцов. Остатки амантадина в образце экстрагировали 1% ацетонитрил-ацетатным раствором, выделяли методом жидкостно-жидкостного разделения с н-гексаном, очищали с помощью твердофазной экстракции, и анализировали методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии в режиме положительных ионов. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта.

Оборудование, расходные материалы и реактивы

Оборудование	Raykol Fotector Plus Высокопроизводительная автоматическая система твердофазной экстракции
	Raykol AP 300 Полностью автоматизированная рабочая станция для обработки жидких образцов
	Raykol AH 50 Автоматический гомогенизатор
	Raykol Auto EVA 80 Высокопроизводительный автоматический параллельный упариватель в токе азота
Расходные материалы	Высокоэффективный жидкостный хроматомасс-спектрометр (ВЭЖХ МС/МС)
Расходные материалы	Картридж ТФЭ RayCure MCX, 60мг/3мл, (RC-204-72855)
Реактивы	Метанол; ацетонитрил; муравьиная кислота (квалификации для ВЭЖХ). Элюент для катионообменной ТФЭ: аккуратно внесите пипеткой 2,5 мл аммиачной воды и 2,5 мл раствора формиата аммония в 95 мл метанола, хорошо перемешайте для последующего использования; фиксирующий раствор: смешайте 70 мл ацетонитрила, 10 мл метанола и 20 мл воды.

Построение градуировочной зависимости

Возьмите исходный стандартный раствор 1,0 мкг/мл и исходный раствор внутреннего стандарта 1 мкг/мл, уравновесьте при комнатной температуре и используйте рабочую станцию автоматической обработки жидких проб AP 300 для приготовления концентраций 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 и 50,0 мкг/л для градуировки.



AP 300 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	50%乙醇水	
2	直接稀释	A1	1000.00	1.00	A31	100.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
3	直接稀释	A11	1000.00	1.00	A12	100.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
4	内标曲线	A31	100.00	1.00	A41	2.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
5	内标曲线	A31	100.00	1.00	A42	5.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
6	内标曲线	A31	100.00	1.00	A43	10.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
7	内标曲线	A31	100.00	1.00	A44	20.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
8	内标曲线	A31	100.00	1.00	A45	50.00	1.00	50%乙醇水	50%乙醇水
9	方法结束								

Подготовка образцов

Приготовление



Очистка



Условия очистки ТФЭ

Автоматический экстрактор	Fotector Plus
Картридж ТФЭ	Гибридный катионообменный (60мг/3 мл)
Активация	Метанол, вода, муравьиная кислота 2%
Промывка	2% раствор муравьиной кислоты, 1% муравьиная кислота в ацетонитриле
Элюирование	Элюент для катионообменных картриджей

Операция	Растворитель	Выход	Поток (мл/мин.)	Объем(мл)	Время(мин)
Очистка канала	CH ₃ OH				2.8
Активация	CH ₃ OH	Орг. оотх.	5	3	1
Активация	H ₂ O	вода	5	3	1
Активация	2% HCOOH	Орг. оотх.	5	3	1
Загрузка		Орг. отх.	1	5	5.6
Промывка	2% HCOOH	Орг. отх.	10	5	0.9
Промывка	1% HCOOH/C ₂ H ₅ OH	Орг. отх.	10	3	0.7
Сушка					15
Элюирование	Элюирующий раствор	Сбор	1	4	4.4
Продувка		Сбор	10	5	1.1
Завершение					

Рис.1. Fotector Plus. Метод твердофазной экстракции

Условия ВЭЖХ

Колонка	C18 (100мм×2.1мм×1.7мкм)
Скорость потока	0.300 мл/мин.
Элюент	A: p-p ацетата аммония (с 0,1% муравьиной к-ты), B: ацетонитрил
Температура колонки	35°C
Объем инъекции	2мкл
Детектор	MS-TQ
Режим ионизации	ESI+
Продувка	11 л/мин
Температура газа	350°C
Напряжение	4000
Давление	35psi
Элюирование	0-2,0 мин ацетонитрил 10%, 4,0-5,0 мин ацетонитрил 50%, 5,5мин-8,0 мин ацетонитрил 10%

Результаты и обсуждение

Чтобы проверить степень извлечения, к образцу свинины и курятины добавляли по 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг и 10,0 мкг/кг соответственно (n=3), данные показаны в таблице 1. Степень извлечения была средней между 80-100%, а значение относительного стандартного отклонения составило около 5%. Это показывает, что приведенный метод может успешно применяться для обнаружения амантадина в продуктах.

Таблица 1. Степень извлечения и значения RSD для образцов свинины и курятины

Образец	Соединение	Диап. лин. коррел. (н г/мл)	Коефф. коррел. R ²	Извлечен. (мкг/кг)	RSD (%)	Средн. показ. извл. (%)
Свинина	Амантадин	2.0нг/мл~50нг/мл	≥0.99	2	2.08	91.3
				4	1.78	92.8
				10	3.08	95
Курица	Амантадин	2.0нг/мл~50нг/мл	≥0.99	2	3.86	90.8
				4	3.89	92.3
				10	1.3	99.6

Выводы

- Остатки амантадина в образце экстрагировали 1% ацетонитрил-ацетатным раствором, выделяли методом жидкостно-жидкостного разделения с н-гексаном, очищали с помощью твердофазной экстракции, и анализировали методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии в режиме положительных ионов. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта.
- Для построения калибровочного графика применялась рабочая станция автоматической обработки жидких проб Raykol AP 300, которая автоматически выполняет подготовку стандартов различной концентрации, добавление пробы и разделение жидкости, не требуя присутствия персонала на протяжении всего процесса. Запрограммированная работа прибора позволяет эффективно избежать ошибок, связанных с человеческим фактором и обеспечить точность и достоверность градуировки.
- Высокая пропускная способность и скорость обработки образцов автоматического гомогенизатора AH-50 от Raykol обеспечивают большое удобство для процесса пробоподготовки. Он автоматически завершает добавление экстракционного раствора, гомогенизацию и очистку головки ножа, ограждая персонал лаборатории от добавления жидкости и неблагоприятного воздействия органических растворителей на организм человека во время гомогенизации.
- Для автоматизации процесса очистки в данном методе использовалась высокопроизводительная автоматическая система твердофазной экстракции Raykol Fotector Plus; которая выполняет процессы от активации, загрузки образца до элюирования в один шаг, позволяя обрабатывать в день до 180 образцов. Для дальнейшей обработки образцов использовался высокопроизводительный автоматический параллельный концентратор Raykol Auto EVA 80. Штативы для образцов Fotector Plus и Auto EVA 80 совместимы, что позволяет использовать обе системы обработки без переноса образцов из пробирки в пробирку. Операция последовательна и проста, а потеря образцов исключена.