

Определение остаточного содержания макролидов в продуктах водного промысла



Макролидные антибиотики (МА) — общий термин для класса антибактериальных препаратов быстрого бактериостатического действия, имеющих в своей молекулярной структуре макроциклическое 14- или 16-членное лактонное кольцо, к которому присоединены один или несколько углеводных остатков, МА ингибируют синтез бактериального белка путем блокирования активности пептидилтрансферазы в 50s рибосомах. Они, в основном, используются для лечения аэробных грамположительных и отрицательных кокков, некоторых анаэробных бактерий, легионелл, микоплазм, хламидий и других инфекций.

Для качественного и количественного определения макролидов в продуктах водного промысла в соответствии с национальным стандартом КНР GB 31660.1-2019 используется метод жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). Остатки макролидов в образцах экстрагировали ацетонитрилом, очищали н-гексаном на колонке с нейтральным оксидом алюминия, определяли методом жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии, для количественного определения использовали метод внешнего стандарта.

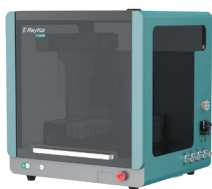
Метод описывает процедуру предварительной обработки образцов. Для очистки целевых соединений использовалась колонка ТФЭ с нейтральным оксидом алюминия, целевые соединения элюировали, концентрировали и повторно растворяли. Остатки девяти макролидов в продуктах водного промысла определяли методом тандемной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

Оборудование, расходные материалы и реактивы

Оборудование	Raykol Fotector Plus - высокопроизводительный автоматический прибор для твердофазной экстракции
	Raykol AP 300 - автоматизированная рабочая станция для обработки жидких проб
	Raykol AH 50 - автоматический гомогенизатор
	Raykol Auto EVA 80 - высокопроизводительный автоматический параллельный концентратор
	ВЭЖХ/МС/МС Жидкостный хроматомасс-спектрометр (тройной квадруполь)
Расходные материалы	Картридж ТФЭ с нейтральным оксидом алюминия (RayCure AL-N, 2 г/6 мл), кат. №: RC-204-16906
Реактивы	Метанол, ацетонитрил, н-гексан (квалификации "для ВЭЖХ"); Ацетонитрил/н-гексан 0,05 моль/л; Раствор ацетата аммония: 0,77 г безводного ацетата аммония растворить в 200 мл воды; Раствор постоянного объема: смешайте 20 мл ацетонитрила с 80 мл ацетата аммония

Построение градуировочной зависимости

Возьмите 0,1 мкг/мл стандартного исходного раствора, уравновесьте при комнатной температуре и используйте автоматическую рабочую станцию для обработки жидких проб AP 300, чтобы приготовить стандарты с концентрацией 2,5, 5,0, 10,0, 20,0 и 50,0 мкг/л.



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	甲醇	
2	直接稀释	A1	100.00	1.00	A41	2.50	1.00	甲醇	甲醇
3	直接稀释	A1	100.00	1.00	A42	5.00	1.00	甲醇	甲醇
4	直接稀释	A1	100.00	1.00	A43	10.00	1.00	甲醇	甲醇
5	直接稀释	A1	100.00	1.00	A44	20.00	1.00	甲醇	甲醇
6	直接稀释	A1	100.00	1.00	A45	50.00	1.00	甲醇	甲醇
7	方法结束								

Подготовка образцов

Подготовка



Очистка



Условия очистки ТФЭ

Экстракция	Fotector Plus
Картридж ТФЭ	с нейтральным Al_2O_3 (2 г/6 мл)
Активация	Ацетонитрил
Элюирование	Ацетонитрил

Процедура	Растворитель	Загрузка	Скорость потока (мл/мин)	Объем (мл)	Время (мин)
Очистка канала образца	CH3CN				2.8
Активация	CH3CN	Орг. отходы	5	5	1.4
Загрузка образца		Орг. отходы	2	36	20.1
Элюирование	CH3CN	Собрать	1	5	5.4
Продувка		Собрать	3	3	1.5
Продувка		Собрать	20	10	1.3
Финиш					

Рисунок-1. Метод твердофазной экстракции Fotector Plus

Условия ВЭЖХ

Колонка ВЭЖХ	C18 (100 мм × 2,1 мм × 1,7 мкм)
Скорость потока	0.300 мл/мин.
Мобильная фаза	А: Раствор ацетата аммония (с 0,1% муравьиной кислотой) В: Ацетонитрил
Температура колонки	35°C
Объем инъекции	2мкл
Детектор	ВЭЖХ/МС/МС
Режим ионизации	ESI+
Газ продувки	11 л/мин.
Температура газа	350°C (азот)
Напряжение	4000
Газ-распылитель	35psi
Градиент	0 мин ацетонитрил 8%, 0-2,0 мин ацетонитрил 8%, 3,0-6,5 мин ацетонитрил 80%, 7,0 мин ацетонитрил 8%, 10 мин ацетонитрил 10%

Результаты и обсуждение

Чтобы проверить степень извлечения данного метода, в образец угря добавили 1,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг и 8,0 мкг/кг стандарта соответственно (n = 3), как показано в таблице-1 ниже, а в образец креветки добавили 1,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг, 8,0 мкг/кг стандарта (n = 3), степень извлечения и значение RSD показаны в таблице-2 ниже:

Таблица 1. Степень извлечения и значения RSD для образцов угря

Образец	Соединение	Диап. лин. коррел. (н г/мл)	Кэфф. коррел. R2	Извлечен. (мкг/кг)	RSD (%)	Средн. показ. извл. (%)
Угерь	Тилмикозин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	13.3	82
				2	10.4	86.3
				4	5.8	91.3
	Трихотецин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	10.99	89
				2	5.49	97.5
				4	4.83	99.4
	Эритромицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	9.6	97
				2	5.56	102.5
				4	4.69	103.2
	Тилозин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	11.27	88
				2	6.89	98.8
				4	4.21	101.3
Китасамицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	9.47	90	
			2	6.54	97.5	
			4	3.26	99.4	
Азитромицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	7.31	92.5	
			2	5.7	100	
			4	2.76	101.3	
Кларитромицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	10.25	98.5	
			2	5	101.3	
			4	3.03	102.6	
Ксантомицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	11.53	95.5	
			2	6.75	98.8	
			4	4.03	99.4	
Спирамицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	9.97	90	
			2	7.1	93.8	
			4	3.4	100.7	

Таблица 1. Степень извлечения и значения RSD для образцов креветок

Образец	Соединение	Диап. лин. коррел. (н г/мл)	Кэфф. коррел. R2	Извлечен. (мкг/кг)	RSD (%)	Средн. показ. извл. (%)
Креветки	Тилмикозин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	6.92	77
				2	12	78.8
				4	6.07	86.3
	Трихотецин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	11.15	86
				2	6.62	95
				4	3.3	93.2
	Эритромицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	8.58	91
				2	5.52	95
				4	4.13	97.6
	Тилозин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	10.82	88.5
				2	6.29	93.8
				4	4.38	94.4
	Китасамицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	11.78	87.5
				2	5.08	92.5
				4	3.32	93.2
	Азитромицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	9.43	97.5
				2	4.68	97.5
				4	3.54	98.8
	Кларитромицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	8.32	99
				2	4.74	98.8
				4	2.18	98.2
	Ксантомицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	9.5	89.5
				2	5.41	92.5
				4	4.13	91.9
Спирамицин	2ng/mL–50ng/mL	≥0.99	1	7.21	100	
			2	7.64	98.8	
			4	9.03	101.3	

Из Таблиц 1, 2 видно, что общая степень извлечения целевых компонентов из образцов угря и креветки составляет от 70% до 110%, а относительное стандартное отклонение <15%. Это показывает, что этот метод может хорошо применяться для обнаружения макролидов в пробах продуктов водного промысла

Вывод

- В данной работе остатки макролидов в образцах экстрагировали ацетонитрилом, обезжировали н-гексаном и очищали на колонке с нейтральным оксидом алюминия для качественного и количественного определения методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХМС/МС).
- 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.
- Высокая пропускная способность и скорость обработки образцов автоматического гомогенизатора Raykol AH-50 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.