

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ СТРЕПТОМИЦИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Е.П. Шупилова, О.В. Шуляковская

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический
центр гигиены», Минск, Беларусь*

Резюме. Оптимизированы параметры настройки масс-детектора, условия хроматографирования и твердофазной экстракции, позволившие добиться максимального отклика стрептомицина при его определении в пробах мясных продуктов методом ВЭЖХ/МС-МС.

Summary. The settings of mass detector, chromatographic conditions and solid-phase extraction was optimized. It allows to achieve a maximum response of streptomycin in samples of meat products by HPLC / MS-MS.

Ключевые слова: Стрептомицин, аминогликозиды, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, твердофазная экстракция.

Keywords: Streptomycin, aminoglycosides, HPLC, mass spectrometry, solid-phase extraction.

Введение. Стрептомицин представляет собой органическое основание, молекула которого состоит из трех частей: стрептидина, стрептозы и N-метилглюкозамина. Наиболее часто в медицинской практике применяют стрептомицина сульфат. Стрептомицина сульфат – порошок или пористая масса белого или почти белого цвета без запаха, горьковатого вкуса, гигроскопичен. Легко растворим в воде, практически не растворим в спирте, хлороформе и эфире. Устойчив в слабокислой среде, но легко разрушается в растворах крепких кислот и щелочей при нагревании. Стрептомицин и его производные обладают широким спектром антибактериальной активности. Они эффективны в отношении большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных и кислотоустойчивых бактерий. Не действуют на анаэробные микробы, спирохеты, риккетсии и вирусы [1]. В Республике Беларусь и в Таможенном Союзе в соответствии с санитарно-гигиеническими требованиями содержание стрептомицина в пищевых продуктах нормируется [2, 3] и не должно превышать 0,2 мг/кг.

Материалы и методы. Объектом исследований являлись консервы мясные для детского питания. Предлагаемый метод определения основан на извлечении стрептомицина раствором трихлоруксусной кислоты, очистке экстракта методом твердофазной экстракции и хроматографическом разделении компонентов с помощью ВЭЖХ в нормально-фазовом варианте с масс-спектрометрическим детектированием при установлении оптимальных условий хроматографирования и настроек масс-детектора.

Идентификацию антибиотика осуществляли по времени удерживания и по соотношению площадей пиков основного и дочернего ионов для анализируемого вещества.

Остаточное количество стрептомицина определяли с помощью жидкостного хроматографа (Agilent 1200) с масс-спектрометрическим детектором (Agilent 6410) с ионизацией электроспреем. Для разделения использовали хроматографическую колонку Atlantis HILIC Silica (2,1×150 мм, зернение 3,0 мкм). В качестве подвижной фазы применяли смесь, содержащую 200 mM формиата аммония и 100 mM муравьиной кислоты – компонент (А) и 1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле – компонент (В) в соотношении 30:70 в начальный момент анализа с

последующим градиентом, приведенным в таблице 1. Скорость подвижной фазы составила $0,3 \text{ см}^3$ в минуту, объем вводимой пробы – 20 мкл, температура термостата колонки – 30°C .

Таблица 1 — Градиент подвижной фазы

Время, мин	200 mM формиата аммония и 100 mM муравьиной кислоты, (A) %	1 %-ный раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, (B) %
0	30	70
0 - 7	от 30 до 90	от 70 до 10
7 - 8	от 90 до 30	от 10 до 70
8 - 16	30	70

Параметры настройки масс-детектора следующие:

- температура газа десольвации 350°C ;
- скорость потока газа десольвации $480 \text{ дм}^3/\text{час}$;
- давление на небулайзере (распылителе) 35 psi.

Для определения содержания стрептомицина взвешивали 5 г пробы в полипропиленовой пробирке объемом 50 см^3 , вносили $500 \text{ нг}/\text{см}^3$ стрептомицина. После этого к пробе добавляли 10 см^3 5 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивали содержимое пробирки в течение 10 минут на вортексе. Далее пробирку с содержимым центрифугировали при скорости 10000 об/мин при температуре 5°C в течение 10 минут. Экстракт отбирали в новую полипропиленовую пробирку пипеточным дозатором, pH полученного экстракта довели до $7,3 \pm 0,1$ с помощью 40 %-ного раствора NaOH, после чего экстракт очищали на картриджах методом твердофазной экстракции.

Картридж предварительно кондиционировали метанолом, уравнивали деионизованной водой, после чего наносили экстракт, промывали картридж деионизованной водой и сушили под вакуумом в течение 5 минут. Стрептомицин элюировали с картриджа раствором 5 %-ной муравьиной кислоты в метаноле. Компоненты полученного экстракта разделяли и регистрировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором. Измерения на масс-спектрометрическом детекторе производили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Результаты и обсуждение. На основании экспериментальных данных установлены оптимальные параметры настройки масс-детектора (напряжение на фрагменторе и энергия диссоциации (энергия соударений)), определены

родительский и оптимальные дочерние ионы, позволившие добиться максимального отклика стрептомицина при его детектировании в градуировочных растворах. На рисунке 1 представлен масс-спектр раствора стрептомицина концентрации 10 мкг/см³ в деионизованной воде в режиме MS2 Scan.

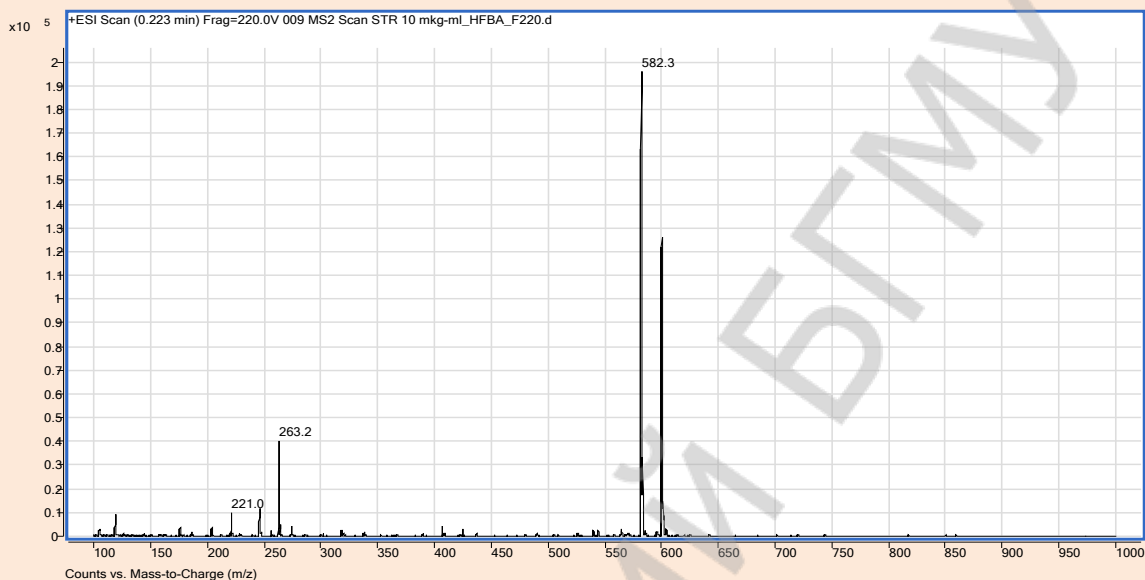


Рисунок 1 – Масс-спектр стрептомицина в режиме MS2 Scan

Из рисунка 1 видно, что родительским ионом (ионом-предшественником) является m/z 582,3, который представляет собой протонированную форму стрептомицина.

В таблице 2 представлены параметры воздействия на ионы стрептомицина в режиме мониторинга множественных реакций (MRM).

Таблица 2 – Параметры воздействия на ионы стрептомицина в режиме MRM с регистрацией положительных ионов (+)

Аналит	Время удерживания, мин	Родитель-ский ион, m/z	Дочерние ионы, m/z	Напряже-ние на фрагмен-торе, В	Энергия соударений, эВ
Стрептомицин	5,5	582,3	263,1	230	35
			246,1		40

По основному дочернему иону стрептомицина проводят количественную обработку данных, а по соотношению дочерних ионов судят о правильности определения.

Изучено удерживание стрептомицина на обращено-фазовой колонке Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1×150 мм, зернение 3,5 микрон). Установлено, что стрептомицин удерживается на обращено-фазовых колонках только при добавлении в подвижную фазу ион-парного реагента (гептафторбутановой

кислоты). Существенным недостатком является высокая стоимость данного реагента и его большой расход в ходе анализа.

Проведены исследования по установлению оптимального режима градиентного элюирования на прямофазной колонке Atlantis HILIC Silica. Нами изучено влияние состава подвижной фазы на величину отклика стрептомицина. В качестве элюента (А) использовали:

1) 100 mM муравьиной кислоты, содержащей 200 mM ацетата аммония;
2) 100 mM муравьиной кислоты, содержащей 200 mM формиата аммония,

3) 100 mM муравьиной кислоты, содержащей 200 mM ацетата натрия.
Элюент (В) – 1 %-ная (об.) муравьиная кислота в ацетонитриле.

Результаты исследований представлены на рисунке 2.

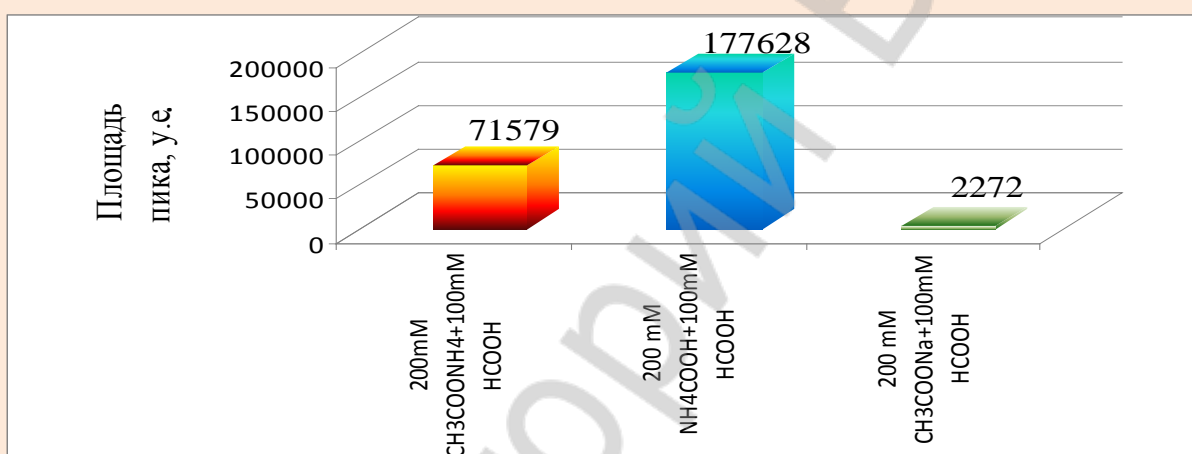
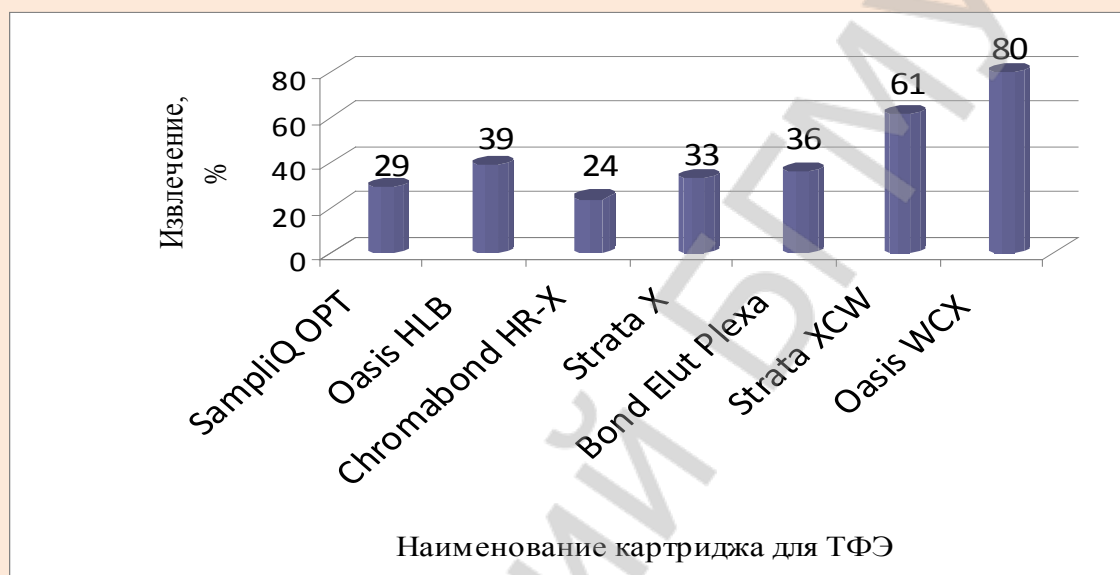


Рисунок 2 – Зависимость площади пика водного раствора стрептомицина концентрации 200 нг/см³ от состава элюента (А)

При использовании в качестве элюента указанных смесей, время удерживания стрептомицина практически не меняется, однако интенсивность его отклика увеличивается практически в 2,5 раза при применении формиата аммония в своем составе. Поэтому в качестве элюента предпочтительнее использовать 100 mM муравьиной кислоты, содержащей 200 mM формиата аммония и ацетонитрил с добавлением 1 %-ной муравьиной кислоты.

Известно, что для очистки пробы и концентрирования аналитов используется твердофазная экстракция. Нами изучено удерживание стрептомицина на картриджах для твердофазной экстракции: Cromabond HR-X, Oasis HLB, SampliQ OPT, Starata X, Bond Elut Plexa, Stata CXW и Oasis WCX. Результаты исследований представлены на рисунке 3. Из рисунка 3 следует, что стрептомицин лучше удерживается на слабых катионнообменных сорбентах на основе силикагеля с привитыми карбоксикислотными группами (Oasis WCX и Strata CWX). Хорошее удерживание аналита объясняется образованием лабильных адсорбционных

комплексов с переносом заряда π - π типа за счет π -взаимодействия между ароматической группой стационарной фазы и ароматическим кольцом молекул стрептомицина, а также за счет образования кулоновских взаимодействий между карбоксильной группой стационарной фазы и молекулой стрептомицина.



Р

Рисунок 3 – Зависимость степени извлечения стрептомицина от используемого картриджа для твердофазной экстракции

Для оптимизации процесса твердофазной экстракции по достижению максимального извлечения аналита нами изучено влияние состава раствора, применяемого для элюирования стрептомицина с картриджа Oasis WCX на величину его извлечения. Для этого в пробу детской мясной консервы вносили 500 нг/см^3 стрептомицина, экстрагировали аналит 5 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты, рН полученного экстракта довели до $7,3 \pm 0,1$, полученный экстракт очищали на картридже для ТФЭ Oasis WCX (6 ml, 150 mg) и элюировали стрептомицин с картриджа 1%, 2% и 5%-ными растворами муравьиной кислоты в метаноле. Результаты исследований представлены на рисунке 4.

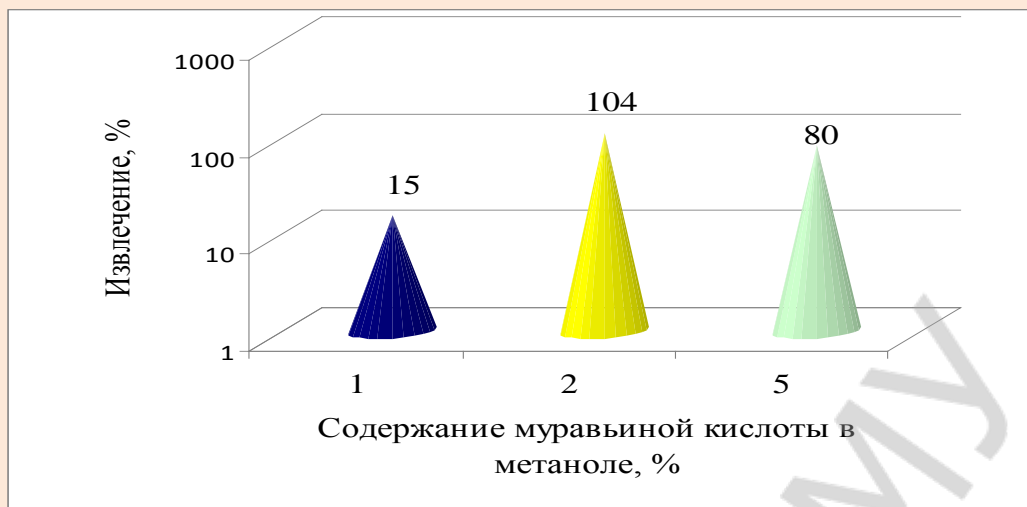


Рисунок 4 – Зависимость степени извлечения стрептомицина с картриджа Oasis WCX от содержания муравьиной кислоты в метаноле

Из рисунка 4 видно, что стрептомицин максимально элюируется с картриджа раствором, содержащим 2 % муравьиной кислоты в метаноле.

Выводы. Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизированы параметры настройки масс-детектора, установлен состав подвижной фазы, позволившие добиться максимального отклика стрептомицина при его детектировании. Изучено удерживание стрептомицина на картриджах для твердофазной экстракции. Показано, что наилучшим образом стрептомицин удерживается на картриджах на основе силикагеля с привитыми карбоксикислотными группами (Oasis WCX), а максимально элюируется с картриджа раствором, содержащим 2 % муравьиной кислоты в метаноле.

Литература

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: / М.Д. Машковский: в 2 ч. – 9-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1984. –Ч.2. – 576 с.
2. Сборник нормативны документов по продовольственному сырью и пищевым продуктам. – Минск: Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», 2014. – 252 с.
3. Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования Таможенного Союза. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 707 с.