

برنامه ال یادداشت ICATION

تحلیل ها و نتایج اسایکلین در حیوانات

نویسندگان:

صباح ریر من

عبیر خالد

آویناش دالمیا

فنگ کین

شرکت پرکین المر

تورنتو

کانادا

نشان ملی

ایالات متحده آمریکا



آنالیز با توان عملیاتی بالا برای تتراسایکلین در بافت های حیوانی با استفاده از سیستم UHPLC/MS/MS مجهز به نمونه گیر خودکار QS-works با ظرفیت بالا

مقدمه

تتراسایکلین ها (TCS) یکی از رایج ترین آنتی بیوتیک هادر تولید حیوانات برای درمان بیماری ها، جلوگیری از عفونت و محافظت از رشد حیوانات هستند. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها ممکن است

منجر به نقض باقی مانده ها در غذاهای حیوانی مانند گوشت، شیر و سایر مواد غذایی می شود و این می تواند خطری برای سلامت انسان باشد. وجود باقی مانده های تتراسایکلین در غذا می تواند باعث سمیت و عوارض جانبی مانند واکنش های آلرژیک و همچنین مقاومت باکتریایی شود که ممکن است به انسان منتقل شود. بنابراین، به منظور محافظت از سلامت انسان، سازمان های نظارتی در سراسر جهان حداکثر سطح باقی مانده (MRL) یا تحمل داروهای دامپزشکی در مواد غذایی را تعیین کرده اند (به عنوان مثال، اتحادیه اروپا، کانادا، چین و بسیاری از کشورهای دیگر "حداکثر سطح باقی مانده داروها در مواد غذایی" را تعیین می کنند، در حالی که در ایالات متحده، این "تحمل" نامیده می شود). استفاده از تکنیک های بسیار حساس و گزینشی برای پایش دقیق تتراسایکلین ها بر اساس الزامات نظارتی، برای محافظت از سلامت انسان ضروری است. این کار، یک روش سریع و حساس UHPLC/MS/MS را برای تجزیه و تحلیل کمی تتراسایکلین ها در گوشت ارائه می دهد. برای افزایش بهره وری آزمایشگاه، از نمونه گیر خودکار با توان عملیاتی بالا QS-Works به دلیل ظرفیت بالا، سینی های کنترل دما و بازوهای رباتیک که امکان کار بدون مراقبت را برای مدت طولانی فراهم می کند، استفاده شد. QS works همچنین به آزمایشگاه ها اجازه می دهد تا حداکثر 600 نمونه را در یک توالی آزمایش کنند که کارایی آزمایشگاه های آزمایش را بهبود می بخشد. روش توسعه یافته، حساسیت، خطی بودن، بازیابی، دقت و گزینش پذیری خوبی را که برای تجزیه و تحلیل تتراسایکلین ها در گوشت در سطوح تحمل پایین تعیین شده توسط نهادهای نظارتی مختلف در جهان مورد نیاز است، نشان داد.



PerkinElmer
For the Better

تجربی

سخت افزار/نرم افزار

جدا سازی کروماتوگرافی با استفاده از دستگاه PerkinElmer QSight انجام شد. سیستم LX50 UHPLC، در حالی که تشخیص با استفاده از QSight PerkinElmer انجام شد. آشکارساز MS/MS مدل 420. برای افزایش بهره وری آزمایشگاه از نمونه بردار خودکار QS Works با ظرفیت بالا استفاده شد. تمام کنترل دستگاه، جمع آوری داده ها و پردازش داده ها با استفاده از پلتفرم نرم افزاری Simplicity 3Q™ انجام شد.

روش LC و شرایط منبع MS

پارامترهای روش LC و منبع MS در جدول 1 نشان داده شده است و گذارهای حالت نظارت بر واکنش چندگانه (MRM) تتراسایکلین ها در جدول 2 نشان داده شده است. حداقل دو گذار MRM برای هر آنالیت پایش شد تا تعداد مثبت و منفی کاذب در روش کاهش یابد. بهینه سازی پارامترهای MS/MS، شامل انتخاب یون های والد و یون های محصول، انرژی های برخورد (CE)، ولتاژهای ورودی (EV)، (CCL2) و غیره، با تزریق استانداردها انجام شد. شرایط منبع با تزریق t-infusion استانداردهای خالص با جریان LC بهینه شد. روش جمع آوری MS بر اساس آن شرایط بهینه ایجاد شد.

جدول ۱. روش LC و پارامترهای منبع MS.

وضعیت LC و MS	
فاز متحرک A	آب (حاوی ۰.۱٪ اسید اگزالیک)
فاز متحرک B	استونیتریل (حاوی ۰.۱٪ اسید فرمیک)
ستون	آفت کش های ۴.۶ × ۱۰۰ PerkinElmer Quasar SPP، میلی متر ۲.۷ میکرومتر، (N9306880) میلی متر
دمای کوره ستونی	۳۰ درجه سانتی گراد
دمای نمونه بردار خودکار	۳۰ درجه سانتی گراد
حجم تزریق	۵ میکرو لیتر
ولتاژ ESI (مثبت)	۵۱۰۰ ولت
گاز خشک کننده	۱۲۰
گاز نیولایزر	۲۵۰
دمای منبع	۳۵۰ درجه سانتی گراد
دمای HSID	۵۰۰ درجه سانتی گراد

جدول ۲. انتقال های MRM.

نام مرکب	پیش ماده یون/دا	محصول یون/دا	CE/V	EV/V	CCL2/V
اکسی تتراسایکلین	۴۶۱.۳	۴۲۶.۳	۲۱ - ۴۹	۳۱ - ۲۵	۱۳۶- ۱۸۰
تتراسایکلین	۴۴۵.۳	۴۲۷.۳	۲۲ - ۱۵	۲۹ - ۲۷	۱۴۴- ۱۲۴
کلروتتراسایکلین	۴۷۹.۲	۱۵۴.۰	۳۴ - ۲۵	۲۶ - ۲۹	۱۳۶- ۱۶۴
داکسی تتراسایکلین	۴۴۵.۳	۱۵۴.۱	۳۵ - ۳۴	۲۹ - ۲۶	۱۴۰- ۱۳۶

استانداردها و آماده سازی نمونه

تمام حلال ها، معرف ها و رقیق کننده های مورد استفاده از نوع LC/MS بودند. تمام استانداردهای TC از شرکت سیگما-آلد ریچ تهیه شدند. شرکت و در آن ذخیره می شود -برای جلوگیری از تخریب، در فریزر در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شود. محلول های دارویی استوک و مخلوط برای اسپایک و کالیبراسیون برای همه TC هادر متانول تهیه شدند. برای جلوگیری از تخریب استانداردها، تمام استانداردهای استوک و کاری تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شدند.

برای تهیه یک نمونه همگن، یک نمونه گوشت نمونه به قطعات کوچک بریده و مخلوط شد. یک گرم از نمونه گوشت همگن به همراه ۸ میلی لیتر محلول آبی ۰.۱ مولار EDTA به یک لوله سانتریفیوژ ۵۰ میلی لیتری اضافه و ورتکس شد. سپس، ۱۷ میلی لیتر استونیتریل به همان لوله اضافه و ورتکس شد. سپس لوله به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد و به دنبال آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، ۸ میلی لیتر از محلول رویی به یک لوله سانتریفیوژ تمیز ۵۰ میلی لیتری منتقل شد و ۵ میلی لیتر هگزان برای چربی زدایی نمونه اضافه شد و لوله به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد. سپس محلول به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۳ میلی لیتر از فاز پایینی به یک لوله سانتریفیوژ ۱۵ میلی لیتری جدید منتقل و با دمیدن نیتروژن بر روی آن در دمای ۵۰- درجه سانتیگراد تبخیر و خشک شد. عصاره خشک شده با حل کردن آن در ۱ میلی لیتر محلول متانول/آب (۳۰/۷۰، حجمی/حجمی) حاوی ۰.۱ مولار اسید اگزالیک، دوباره آماده شد. قبل از تزریق به سیستم LC/MS/MS، عصاره های نمونه با استفاده از فیلترهای سرنگی PTFE ۰.۲ میکرومتری ورتکس و فیلتر شدند. ۳.

نتایج و بحث

هدف از این کار ارزیابی عملکرد نمونه بردار خودکار QS-Works با ظرفیت بالا و یک روش آماده سازی نمونه معتبر برای تعیین تتراسایکلین ها در گوشت بود. استفاده از نمونه بردار خودکار با توان عملیاتی بالا مانند QS-Works، کارایی و بهره وری آزمایشگاه های آزمایش را بهبود می بخشد. برای آزمایشگاه های آزمایش مواد غذایی با تعداد زیادی نمونه، QS-Works امکان پردازش سریع تر نمونه های بیشتر را فراهم می کند، در حالی که به دلیل واحد نمونه برداری رباتیک، کیفیت و ثبات داده ها را بهبود می بخشد (شکل 1).

حداکثر سطوح باقیمانده (MRL) تعیین شده برای تتراسایکلین ها در مواد غذایی توسط وزارت بهداشت کانادا یا میزان تحمل توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) به عنوان سطوح هدف مرجع (X در جدول 3) استفاده شدند و آستانه تشخیص (سطح غربالگری «بله/خیر») باید در یا کمتر از ۰.۵X باشد. شکل ۲ کروماتوگرام های (XIC) ۴ تتراسایکلین را با وضوح پیک خوب نشان می دهد. دو انتقال یونی برای اهداف شناسایی و تأیید پایش شدند. این امر منجر به گزینش پذیری و اختصاصیت بالاتر در شناسایی می شود. تمام نسبت های یونی با محاسبه مساحت پیک برای یون با شدت کمتر به مساحت پیک برای یون با شدت بیشتر برای تولید نسبت های یونی محاسبه شدند.

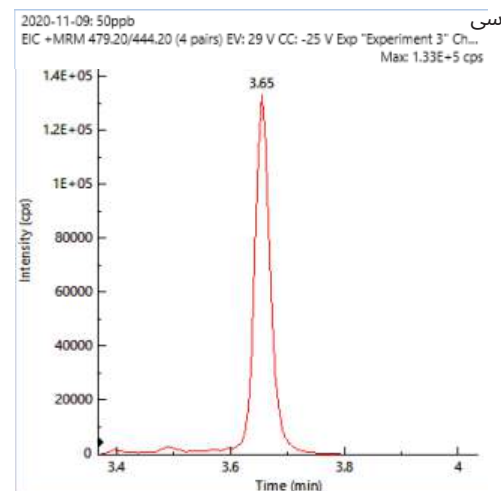
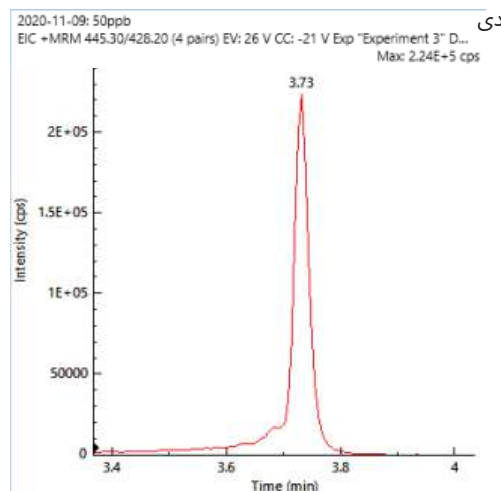
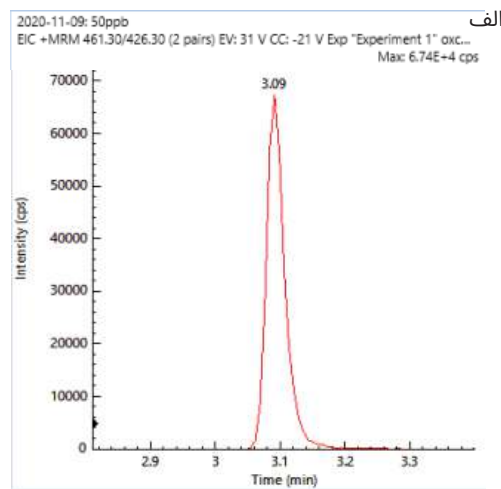
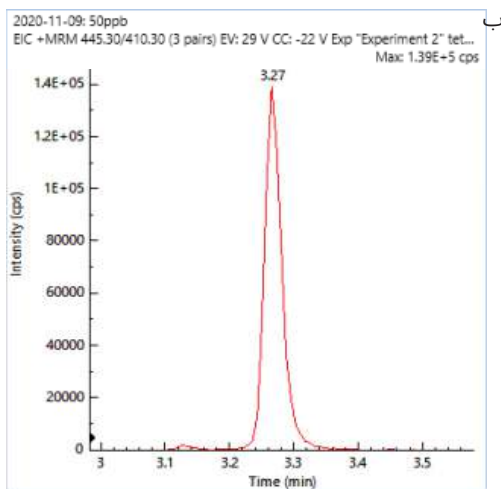
اثرات ماتریس نمونه (MES) نگرانی های اصلی برای توسعه روش MS/MS/LC، به ویژه برای تجزیه و تحلیل مواد غذایی به دلیل تنوع و پیچیدگی ماتریس های نمونه مواد غذایی هستند. ESI در حضور اجزای ماتریس رقیب بار، مستعد سرکوب یونیازسیون آنالیت ها است. اثرات افزایش ناشی از ماتریس نیز در ESI رخ می دهد که می تواند باعث ایجاد یک بایاس بزرگ در تعیین مقدار شود. برای غلبه بر ME های نمونه، از چندین رویکرد استفاده شده است، مانند رقیق سازی نمونه، استفاده از استانداردهای داخلی ایزوتوپ پایدار، کالیبراسیون منطبق با ماتریس (MM)، افزودن استاندارد، تمیز کردن نمونه و استفاده از ستون های با راندمان بالا برای جداسازی بهبود یافته. اثرات ماتریس نمونه (MES) با مقایسه شیب منحنی های کالیبراسیون به دست آمده از ماتریس نمونه گوشت با شیب های به دست آمده از فقط معرف (RO) ارزیابی شدند. ME نمونه (%) برای هر آنالیت با اختلاف درصد بین شیب ها محاسبه شد. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، ME ها برای اکثر ترکیبات کمتر از ۲۰٪ بودند. برای غلبه بر اثرات ماتریس و کاهش تغییرات در نتایج تحلیلی، در این مطالعه از کالیبراسیون های منطبق با ماتریس برای تعیین مقدار همه آنالیت ها استفاده شد. کالیبراسیون با استفاده از



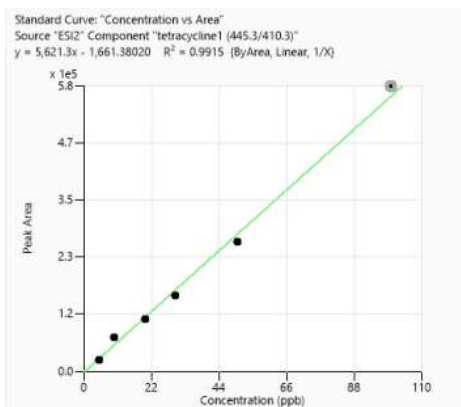
شکل ۱. نمونه گیر خودکار QS-Works

هر دو استاندارد منطبق با ماتریس (MM) و فقط معرف ها (RO). تمام منحنی های کالیبراسیون ساخته شده از هر دو ماتریس RO و نمونه گوشت، خطی بودن خوبی با ضریب همبستگی (R^2) بزرگتر از 0.99 نشان دادند (برای مثال های معمول منحنی های کالیبراسیون به شکل های 3 و 4 مراجعه کنید). انتقال با تزریق معرف شاهد پس از یک استاندارد با غلظت بالا ارزیابی شد و هیچ انتقالی در هیچ یک از آزمایش ها مشاهده نشد. برای جلوگیری از کیلیت شدن تتراسایکلین ها توسط یون های فلزی قطعات LC یا بدنه ستون و حفظ شکل پیک خوب و تکرارپذیری در طول آزمایش، اسید اگزالیک به فاز متحرک آبی اضافه شد. در نتیجه، این روش دقت خوبی با RSD کمتر از 5٪ برای پنج تکرار نشان داد. جدول 3 همچنین تأثیر استفاده از اسید اگزالیک در فاز متحرک و حلال بازسازی شده را بر تکرارپذیری فهرست می کند. همانطور که مشاهده می شود، تکرارپذیری و شکل پیک همه آنالیت ها با افزودن اسید اگزالیک به فاز متحرک و حلال بازسازی شده بهبود یافته است. LOQ برای هر تتراسایکلین مورد تجزیه و تحلیل کمتر از سطح تحمل مجاز آنها در نمونه های گوشت بود. این نشان می دهد که این روش برای تجزیه و تحلیل تتراسایکلین در گوشت در سطح تحمل، بیش از حد کافی حساس است. محدودیت های کمی سازی (LOQs) برای TC ها بر اساس نسبت سیگنال به نویز (S/N) 10 تخمین زده شد و همه LOQ ها برای داروهای مورد مطالعه 1.0 ± 1.5 میکروگرم در لیتر هستند. نتایج نشان داد که روش توسعه یافته می تواند برای غربالگری سریع و

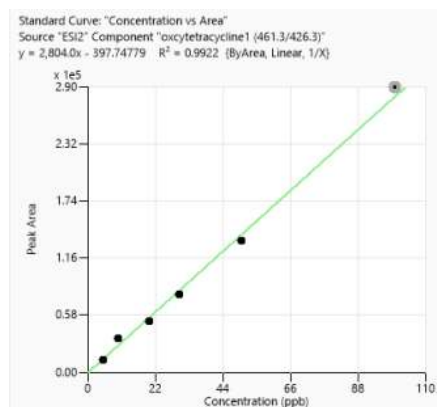
تعیین مقدار تتراسایکلین ها در نمونه های گوشت. بازیابی مطلق تتراسایکلین هادر محدوده 70 تا 120 درصد بود (به جدول 3 مراجعه کنید). درآینده، می توان از تتراسایکلین دوتره برای جبران تلفات تتراسایکلین ها با این فرآیند استخراج استفاده کرد.



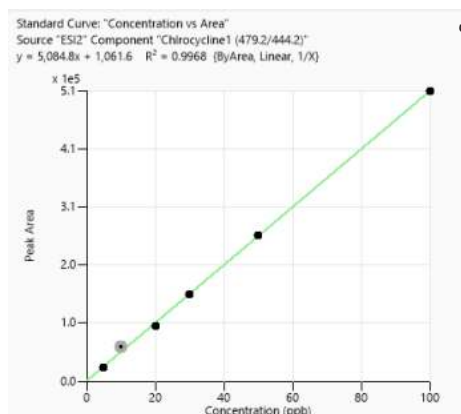
شکل ۲. کروماتوگرام های XIC مربوط به الف) اکسی تتراسایکلین، ب) تتراسایکلین، ج) کلر تتراسایکلین، د) داکسی تتراسایکلین.



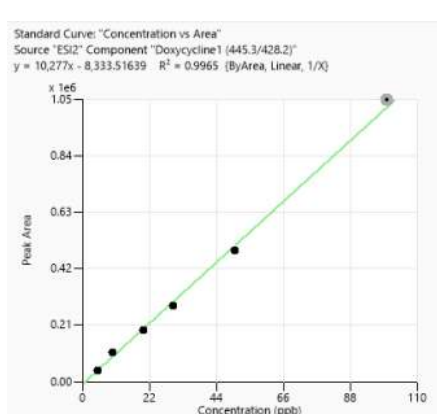
ب



الف

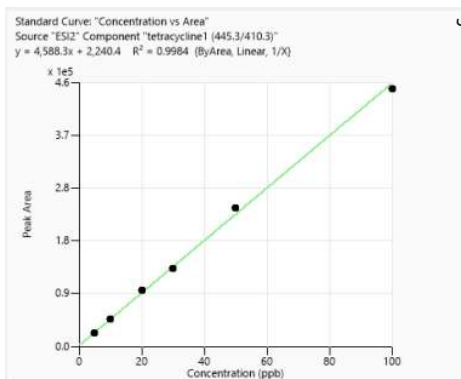


دی

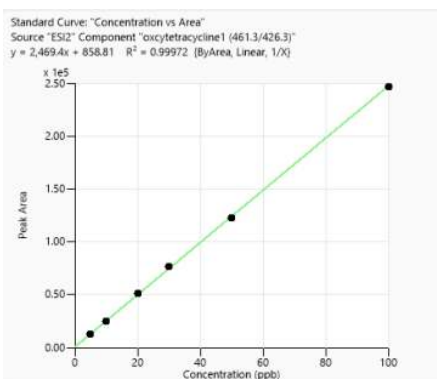


سی

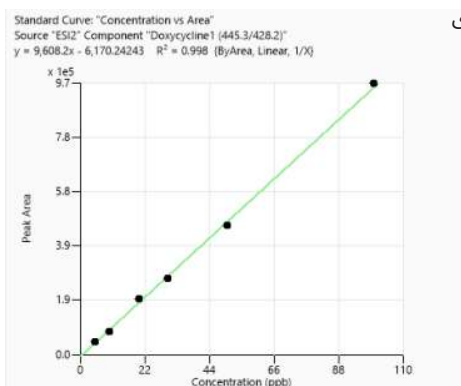
شکل ۳. منحنی های کالیبراسیون تتراسایکلین ها که از استانداردهای تهیه شده فقط در معرف بدست آمده اند.



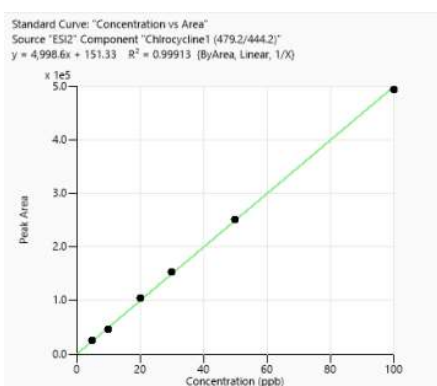
ب



الف



دی



سی

شکل ۴. منحنی های کالیبراسیون تتراسایکلین های به دست آمده از استانداردهای تهیه شده در ماتریس نمونه گوشت.

جدول ۳. نتایج زمان ماند، اثر ماتریس (ME)، خطی بودن، بازیابی و تکرارپذیری (RSD%).

نام مرکب	سطح (نانوگرم بر گرم تحمل (x)	آرتی (دقیقه)	من (%)	خطی بودن (r)	بهبودی (%)	(%) با اسید اگزالیک RSD (n=5)	(%) بدون اسید اگزالیک RSD (n=5)
اکسی تتراسایکلین	۲۰۰	۳.۰۹	۸۶	۰.۹۹۸۴	۷۰.۰	۴.۶	۱۱.۰
تتراسایکلین	۲۰۰	۳.۲۶	۸۰	۰.۹۹۹۷	۱۱۶.۰	۴.۹	۱۶.۰
کلروتتراسایکلین	۲۰۰	۳.۶۵	۹۶	۰.۹۹۹۱	۸۷.۳	۱.۹	۹.۵
داکسی تتراسایکلین	۲۰۰	۳.۷۳	۹۴	۰.۹۹۸۰	۷۱.۶	۱.۵	۸.۰

نتیجه گیری

یک روش UHPLC/MS/MS با استفاده از یک نمونه بردار خودکار QS-Works بتوان عملیاتی بالا از PerkinElmer و LX 50 UHPLC متصل به یک سیستم QSight 420 MS/MS توسعه داده شده است که حساسیت خوبی را برای شناسایی و تعیین مقدار تتراسایکلین ها در یک نمونه گوشت همگن نشان می دهد. سطوح تشخیص پایین به دست آمده در این روش می تواند به پشتیبانی از محدودیت های نظارتی پایین برای غربالگری معمول و تجزیه و تحلیل کمی کمک کند.

منابع

۱. فهرست حداکثر میزان مجاز باقیمانده (MRL) برای داروهای دامپزشکی در مواد غذایی، وزارت بهداشت کانادا، آگوست ۲۰۱۷. <https://www.canada.ca/en/healthcanada/services/drugs-health-products/veterinary-drugs/maximum-residue-limits-mrls/list-maximum-residue/en/healthcanada/services/drugs-health-products> دسترسی در نوامبر ۲۰۲۰.
۲. الزامات عملکرد روش استاندارد (SMPRs)® برای روش غربالگری و شناسایی بقایای داروهای دامپزشکی تحت نظارت در غذا. https://www.aoc.org/smp2018_010.pdf دسترسی در نوامبر ۲۰۲۰.

۳. اورلین دیمارشلیه، سباستین آنیزان، مای مین تین، ماری-کلود ساوی و سیندی بیون (2018) تعیین پنج تتراسایکلین و اپیمرهای آنها توسط MS/MS-LC بر اساس استخراج مایع-مایع با جداسازی در دمای پایین، A, 35:4, 687-695, DOI: 10.1080/19440049.2018.1427894 Food Additives & Contaminants: Part



شرکت پرکین المر
خیابان وینتر، پلاک ۹۴۰
والتام، ماساچوست 02451 ایالات متحده
آمریکان: (800) 4000-762 یا (۱۰) 4602-925-203
www.perkinelmer.com

برای مشاهده فهرست کامل دفاتر جهانی ما، به www.perkinelmer.com/ContactUs مراجعه کنید.

کپی رایت © ۲۰۲۱، شرکت PerkinElmer، تمامی حقوق محفوظ است. PerkinElmer یک علامت تجاری ثبت شده PerkinElmer, Inc. است. سایر علائم تجاری متعلق به صاحبان مربوطه می باشند.