

Многокомпонентный анализ остаточных количеств ветеринарных препаратов в бычьей печени методом ЖХ-МС-МС

**Agilent Bond Elut QuEChERS
Enhanced Matrix Removal—Lipid**

Рекомендации по применению

Анализ продуктов питания и сельское хозяйство

Авторы

Лимиан Жао (Limian Zhao), Дэрик Лукас
(Derick Lucas)

Agilent Technologies, Inc.

Аннотация

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) является продуктом для пробоподготовки нового поколения и прекрасно подходит для дисперсионной твердофазной экстракции (дТФЭ). Материал является высокоселективным по отношению к совместно экстрагируемым матрицам, особенно жиросодержащим образцам (содержание жира > 5%), не оказывающим негативного влияния на извлечение аналита. Настоящее исследование демонстрирует применение этого инновационного продукта для анализа 30 представленных ветеринарных препаратов в бычьей печени. Процедура включает быстрое и эффективное осаждение белка посредством экстракции подкисленным ацетонитрилом, после чего используется EMR—Lipid dSPE и полировочный набор для дополнительной очистки. Объем матрицы, извлеченный посредством протокола EMR-Lipid, определялся по весу коэкстрактивных веществ и экспериментов по экстрагированию веществ, прошедших через колонку. По сравнению с другими приборами для выделения матриц EMR—Lipid dSPE обеспечивает более эффективную очистку матрицы и более высокие выходы аналита. Оптимизированный метод EMR—Lipid позволяет добиться превосходной чистоты, высокой точности и воспроизводимости для всех 30 соединений ветеринарных препаратов на всех уровнях, что дает возможность производить быстрый, надежный и эффективный анализ проб с высоким содержанием жира.



Agilent Technologies

Введение

Ветеринарные препараты широко используются в животноводстве и пищевой промышленности для предотвращения заболеваний и в качестве стимуляторов роста. Эти препараты накапливаются в тканях животных, поэтому неправильное применение может привести к накоплению препаратов в употребляемых в пищу тканях животных, что, как известно, угрожает здоровью человека. В целях повышения пищевой безопасности почти в каждой стране были приняты нормативы, ограничивающие содержание лекарственных препаратов, применяемых в пищевом животноводстве [1-4].

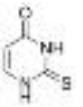
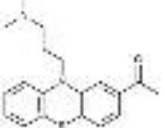
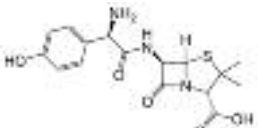
Такие продукты питания животного происхождения, как мышечная ткань, печень и яйца, обычно имеют сложный химический состав, и поэтому крайне важно использовать эффективный метод пробоподготовки, включающий общую экстракцию и эффективную очистку. Общепринятые методы пробоподготовки включают традиционную экстракцию растворителем, твердофазную экстракцию (ТФЭ) или комбинацию нескольких методик. Эти методы, отличающиеся значительными затратами труда и времени, подходят только для ограниченного количества классов соединений и требуют дополнительной разработки методов.

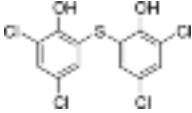
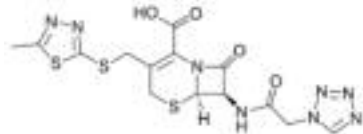
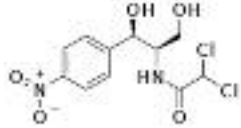
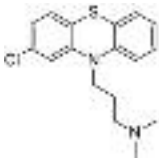
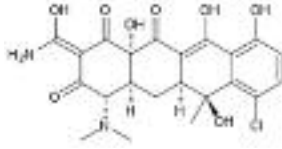
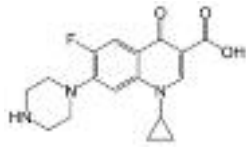
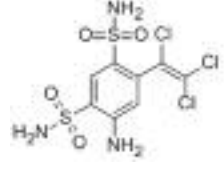
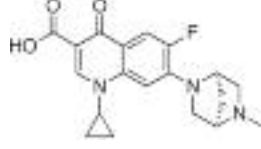
Методы, позволяющие работать с соединениями различных классов и выполнять многокомпонентный анализ остаточных количеств веществ, набирают все большую популярность в программах мониторинга на соответствие нормативным требованиям благодаря расширенным границам аналитических исследований и эффективности применения в лаборатории. Количество ветеринарных препаратов, подвергаемых мониторингу, увеличилось за последние несколько лет, и теперь их больше 100 [5-8]. Предварительная подготовка образца обычно включает экстракцию смесью ацетонитрила с водой, после чего следует очистка C18, другие методики очистки или и то и другое. Такие сорбенты, как C18,

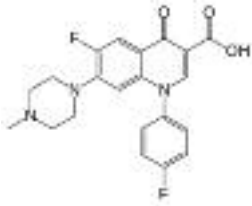
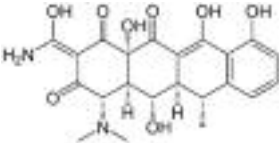
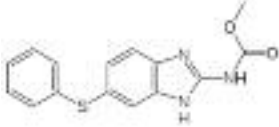
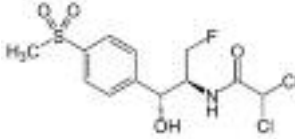
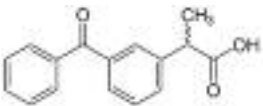
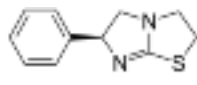
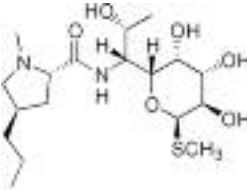
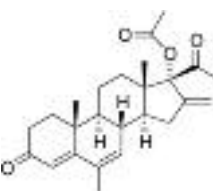
обеспечивают только ограниченное извлечение совместно экстрагируемых жиров, что может привести к осаждению финальной пробы при разбавлении или растворении. Образование осадка требует фильтрации пробы перед вводом в ЖХ-МС-МС и может привести к потере аналита. Во время дисперсионной твердофазной экстракции (дТФЭ) для удаления совместно экстрагируемых жиров можно добавить гексан, но это снижает селективность, приводит к затратам-времени и извлечению гидрофобных аналитов. Применение материалов с циркониевым сорбентом для очистки позволяет повысить ее эффективность по сравнению с C18, но также приводит к большей потере аналита, особенно для соединений, содержащих группы карбоновых кислот и гидроксилы, например, фторхинолины, тетрациклины и макролиды [7,8].

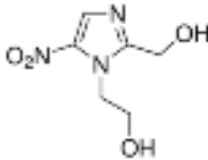
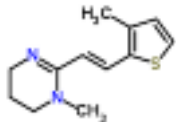
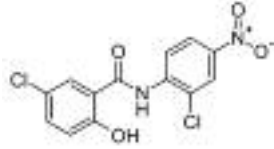
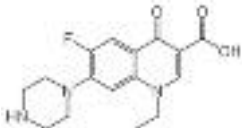
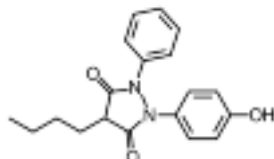
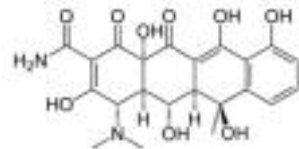
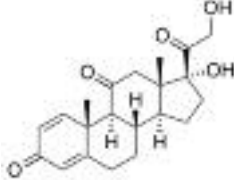
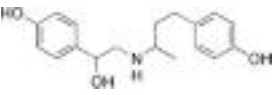
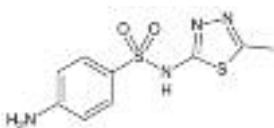
Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR—Lipid) является инновационным сорбентом, который селективно извлекает жиры основных классов из пробы без нежелательного задерживания аналита. Извлечение жировых помех из комплексных матриц особенно важно для таких методик, как QuEChERS, и для осаждения белка. Поскольку эти простые методы пробоподготовки не позволяют удалять значительные процентные содержания жиров, коэкстрактивные вещества остаются в экстракте последней пробы с целевыми аналитами. Это приводит к возникновению хроматографических аномалий, невысокой воспроизводимости данных и точности и к усложнению технического обслуживания. В этой работе мы исследуем инновационный подход к пробоподготовке для анализа 30 распространенных ветеринарных препаратов сложного состава в бычьей печени с помощью простого осаждения белка посредством экстракции и последующей очистки EMR-Lipid. Выбранные ветеринарные препараты представляют 17 различных классов, включая гидрофильные, гидрофобные, кислые, нейтральные и основные вещества. В Таблице 1 приведены данные о химических структурах и нормативных требованиях по концентрации изучаемых ветеринарных препаратов.

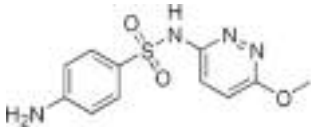
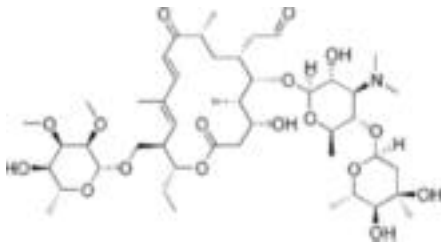
Таблица 1. Физико-химические характеристики ветеринарных препаратов

Название	Класс препарата	Log P	pKa	Молекулярная формула	Структура кристаллов	Разрешенное в США содержание (нг/г)
2-Тиоурацил	Тиреостат	-0,28	7,75	$C_4H_4N_2OS$		Нет сведений
Ацетопромазин	Транквилизатор	3,49	9,3	$C_{19}H_{22}N_2OS$		Нет сведений
Амоксициллин	β -Лактам	0,86	2,4	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$		0,01

Название	Класс препарата	Log P	pKa	Молекулярная формула	Структура кристаллов	Разрешенное в США содержание (нг/г)
Битионол	Флукицид	5,51	4,82	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$		Нет сведений
Цефазолин	Цефалоспорин	-1,5	2,3	$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$		Нет сведений
Хлорамфеникол	Феникол	1,14	5,5	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$		(с)
Хлорпромазин $C_{17}H_{19}ClN_2S$	Транквилизатор		5,20	9,3		Нет сведений
Хлортетрациклин	Тетрациклин	0,24	3,3; 7,4; 9,3	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$		2 (d)
Ципрофлоксацин	Фторохинолон	0,28	6,09; 8,74	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$		(с)
Клорсулон	Флукицид	1,25	—	$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$		0,1 (е)
Данофлоксацин	Фторохинолон	1,2	6,04	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$		0,02 (а, е)

Название	Класс препарата	Log P	pKa	Молекулярная формула	Структура кристаллов	Разрешенное в США содержание (нг/г)
Дифлоксацин	β -Лактам	2,78	5,85	$C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$		Нет сведений
Доксициклин	Тетрациклин	-0,54	3,4	$C_{22}H_{24}N_2O_8$		Нет сведений
Фенбендазол	Антигельминтик	3,75	10,27	$C_{15}H_{13}N_3O_2S$		0,4 (e, h), 2 (b)
Флорфеникол	Феникол	-0,12	10,73	$C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$		0,2 (b)
Кетопрофен	Транквилизатор	2,81	3,88	$C_{16}H_{14}O_3$		Нет сведений
Левамизол	Антигельминтик	1,85	8,0	$C_{11}H_{12}N_2S$		0,1 (e)
Линкомицин	Линкозамид	0,91	7,8	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$		0,1 (b)
Меленгестерол ацетат (МГА)	другие	4,21	11,42	$C_{25}H_{32}O_4$		0,025 (g)

Название	Класс препарата	Log P	pKa	Молекулярная формула	Структура кристаллов	Разрешенное в США содержание (нг/г)
Метонидазол-ОН	Нитромидазол	-0,81	3,09	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄		(с)
Морантел	Антигельминтик	1,97	>12	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S		Нет сведений
Никлозамид	Флукицид	5,41	5,6	C ₁₃ H ₈ C ₁₂ N ₂ O ₄		Нет сведений
Норфлоксацин	Фторохинолон	0,82	6,32	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(с)
Оксифенилбутазон	НПВП	2,72	4,87	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃		Нет сведений
Окситетрациклин	Тетрациклин	-1,5	3,27	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉		2 (d)
Преднизон	Кортикостероид	1,57	12,58	C ₂₁ H ₂₆ O ₅		Нет сведений
Рактопамин	β-Агонист	1,65	9,4	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃		0,03 (е)
Сульфаметизол	Сульфонамид	0,51	5,45	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂		Нет сведений

Название	Класс препарата	Log P	pKa	Молекулярная формула	Структура кристаллов	Разрешенное в США содержание (нг/г)
Сульфаметоксипиридазин	Сульфонамид	0,32	6,7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S		Нет сведений
Типозин	Макролид	3,27	7,7	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇		0,2 (f)

a Допустимое содержание в печени КРС (для туплатромицина было установлено остаточное количество маркера)

b Допустимое содержание в мышечной массе свиней

c Запрещено использование в несоответствии с утвержденной инструкцией по применению

d Допустимое содержание представляет собой совокупность остаточных количеств тетрациклина, включая хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин в мышечной ткани

e Допустимое содержание в мышечной ткани КРС

f Допустимое содержание в жировой ткани, мышечной ткани, печени и почках КРС, не подвергавшихся термальной обработке

g Допустимое содержание в жировой ткани КРС

h Допустимое содержание в мышечной ткани коз

Экспериментальная часть

Все использованные реагенты и растворители были аналитической чистоты или предназначены для жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). Ацетонитрил (ACN) — производства фирмы Honeywell (Маскигон, Мичиган, США). Диметилсульфоксид (ДМСО), стандарты на ветеринарные препараты и внутренние стандарты — производства фирмы Sigma-Aldrich, Corp. (Сент Луис, Миссури, США). Муравьиная кислота, чистая для анализа — производства компании Agilent (каталожный номер G2453-86060). Ацетат аммония (NH₄OAc) — производства компании Fisher Chemicals (Фэйр-Лоун, Нью-Джерси, США).

Растворы и стандарты

Свежий 5%-ый раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (ACN) готовили путем добавления 55 мл муравьиной кислоты к 95 мл ацетонитрила (ACN). Основной раствор ацетата аммония (1 М) был получен растворением 19,27 г ацетата аммония в 250 мл воды марки Milli-Q. Раствор хранился при температуре 4 °C. Раствор ацетата аммония в воде 5 mM готовился с добавлением 5 мл основного раствора ацетата аммония 1 М к 1 л воды марки Milli-Q.

Стандартный основной раствор и основной раствор внутреннего стандарта были приготовлены в растворе ДМСО концентрацией 2 мг/мл, кроме основного раствора данофлораксина в ДМСО с концентрацией 1 мг/мл и основного раствора ципрофлоксацина в ДМСО с концентрацией 0,25 мг/мл. Основные растворы амоксициллина и цефазолина готовились в воде с концентрацией 2 мг/мл. Все основные

растворы готовились во флаконах из желтого стекла, кроме пластиковых флаконов для основных растворов амоксициллина и цефазолина. Все основные растворы хранились при температуре –20 °C. 30 соединений разделили на две группы, G1 и G2, в зависимости от отклика прибора. Комбинированный стандартный рабочий раствор 25/5 мкг/мл (G1/G2) готовился в смеси ацетонитрила и воды, взятых в соотношении 1:1. Рабочий раствор внутреннего стандарта флуниксина-d₃ (25 мкг/мл) готовился в смеси ацетонитрила и воды, взятых в соотношении 1:1.

Оборудование

Для пробоподготовки использовались следующее оборудование и материалы:

- Geno/Grinder (SPEX, Метучен, шт. Нью-Джерси, США);
- центрифуга Centra CL3R (Thermo IEC, шт. Массачусетс, США);
- микроцентрифуга Eppendorf (Brinkmann Instruments, Вестбери, шт. Нью-Йорк, США);
- обычный вортекс и вортекс для нескольких пробирок (VWR, Раднор, шт. Пенсильвания, США);
- дозирующая насадка (VWR, Южный Плейнфилд, шт. Нью-Джерси, США);
- пипетки и автоматический дозатор Eppendorf;
- Трубки Agilent Bond Elut EMR—Lipid (каталожный номер 5982-1010), окончательная полировка Agilent Bond Elut Final Polish for Enhanced Matrix Removal-Lipid (каталожный номер 5982-0101)

Оборудование

Анализ был выполнен на системе ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity, состоящей из следующих компонентов:

- четырехканальный насос Agilent 1290 Infinity (G4204A);
- Высокопроизводительный автосамплер Agilent 1290 Infinity (G4226A), оборудованный термостатом Agilent 1290 Infinity (G1330B) и отделением термостатируемой колонки Agilent 1290 Infinity (G1316C)

Система УВЭЖХ была подсоединена к трехквadrупольной системе ВЭЖХ-МС Agilent 6490, оборудованной электроспреем Agilent Jet Stream в качестве источника ионизации и технологией iFunnel. Для сбора и анализа данных применялось ПО Agilent MassHunter Workstation.

Параметры оборудования

Условия ВЭЖХ

Колонка:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 Ч 150 мм, 2,7 мкм (каталожный номер 693775-902), Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC Guard, 2,1 Ч 5 мм, 2,7 мкм (каталожный номер 821725-911)	
Подвижная фаза:	А) 0,1% муравьиной кислоты в воде В) 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле	
Скорость потока:	0,3 мл/мин	
Температура колонки:	40 °C	
Температура автосамплера:	4 °C	
Вводимый объем:	3 мкл	
Промывка иглы:	раствор 1:1:1 ацетонитрил:метанол:изопропиловый спирт:вода с 0,2% муравьиной кислоты	
Градиент:	Время (мин)	%В
	0	10
	0,5	10
	8,0	100
Время остановки:	12 мин	
Время постобработки:	3 мин	

Условия, МС

Режим положительных/отрицательных ионов

Температура газа:	120 °C	
Расход газа:	14 л/мин	
Давление газа распылителя:	40 psi	
Нагреватель покровного газа:	400 °C	
Расход покровного газа (Sheath gas):	12 л/мин	
Капиллярная:	3000 В	
Параметры iFunnel:	Положи- тельные	Отрицательные ионы
RF при высоком давлении	90 В	90 В
RF при низком давлении	70 В	60 В

Условия МС DMRM, связанные с аналитами, приведены в таблице 2, а стандартная хроматограмма показана на рис.ке 1.

Пробоподготовка

Конечная процедура пробоподготовки была оптимизирована за счет следующих шагов.

1. Отвесить 2 г ($\pm 0,1$ г) гомогенизированной бычьей печени в центрифужную пробирку на 50 мл.
2. Добавить 10 мл подкисленного ацетонитрила (содержащего 5% муравьиной кислоты).
3. Смешать пробы с помощью механической мешалки в течение 2 минут.
4. Поместите в центрифугу и экстрагируйте при 5000 об/мин в течение 5 минут.
5. Добавить 5 мл буферного раствора ацетата аммония (5 мМ) в пробирку EMR-Lipid dSPE на 15 мл.
6. Перенести 5 мл надосадочной жидкости в пробирку EMR—Lipid.
7. Немедленно перемешать вращательными движениями, чтобы равномерно распределить пробу, затем перемешивать в течение 60 секунд в многопозиционном планшете вортекса.
8. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут.
9. Перенести 5 мл надосадочной жидкости в полированную пробирку EMR—Lipid на 15 мл, содержащую 2 г солей (1:4 NaCl:MgSO₄), и перемешивать в течение 1 минуты.
10. Центрифугировать при 5000 об/мин в течение 3 минут.
11. Влить 200 мкл верхнего слоя ацетонитрила и 800 мкл воды во флакон для пробы на 2 мл и перемешать.

Таблица 2. Параметры DMRM ЖХ-МС_МС и время удерживания для целевых аналитов

Аналит	Время удерживания (мин)	Изменение времени удерживания (мин)	Полярность	Родительский ион (m/z)	Дочерный ион			
					Ион-квантификатор	Эн. соудар. (В)	Ион-квантификатор	Эн. соудар. (В)
2-тиоурацил	1,41	2	Отрицательно заряженные ионы	127	57,9	17	—	—
Амоксициллин	1,84	2	Положительно заряженные ионы	366,1	349,2	5	114	25
Метронидазол-ОН	2,07	2	Положительно заряженные ионы	188,1	123,1	9	126,1	13
Левамизол	3,4	2	Положительно заряженные ионы	205,1	178,1	21	91,1	41
Линкомицин	3,35	2	Положительно заряженные ионы	407,2	126,1	37	70,1	80
Норфлоксацин	4,22	2	Положительно заряженные ионы	320,1	302,2	21	276,1	17
Окситетрациклин	4,24	2	Положительно заряженные ионы	461,2	426,1	17	443,2	9
Ципрофлоксацин	4,31	2	Положительно заряженные ионы	332,1	231	45	314,3	21
Данофлоксацин	4,42	2	Положительно заряженные ионы	358,2	340,2	21	81,9	53
Рактопамин	4,4	2	Положительно заряженные ионы	302,2	107	33	77	77
Морантел	4,9	2	Положительно заряженные ионы	221,1	123,1	37	76,9	80
Цефазолин	4,65	2	Положительно заряженные ионы	455	323,1	9	156	13
Сульфаметизол	4,65	2	Положительно заряженные ионы	271	156,1	13	92	29
Сульфаметоксипиридазин	4,69	2	Положительно заряженные ионы	281,1	92	33	65,1	57
Дифлоксацин	4,83	2	Положительно заряженные ионы	400,2	382	25	356,3	17
Хлортетрациклин	5,11	2	Положительно заряженные ионы	479,1	444,2	21	462,1	17
Доксициклин	5,24	2	Положительно заряженные ионы	445,2	428,1	17	410,2	25
Флорфеникол	5,47	2	Отрицательно заряженные ионы	300,1	268,1	25	159,1	41
Хлорамфеникол	5,68	2	Отрицательно заряженные ионы	321	152	17	257,1	9
Тилозин	5,85	2	Положительно заряженные ионы	916,5	173,9	45	772,5	33
Клозулон	5,86	2	Отрицательно заряженные ионы	377,9	341,9	9	—	—
Преднизон	5,88	2	Положительно заряженные ионы	359,2	147,2	33	341,2	9
Ацетопромизин	5,93	2	Положительно заряженные ионы	327,2	86	21	58	45
Хлорпромазин	6,49	2	Положительно заряженные ионы	319,1	86	21	58,1	45
Фенбендазол	6,77	2	Положительно заряженные ионы	300,1	268,1	25	159,1	41
Кетопрофен	6,8	2	Положительно заряженные ионы	255,1	208,9	13	77	57
Оксифенбутозон	7,27	2	Отрицательно заряженные ионы	323,1	133,9	25	295	17
Флуниксин-d ₃	7,53	2	Отрицательно заряженные ионы	298,1	254,2	17	192	37
Флуниксин-d ₃	7,53	2	Положительно заряженные ионы	300,1	282	25	264	41
Меленгестрол ацетат	8,78	2	Положительно заряженные ионы	397,2	337,4	13	279,2	21
Никлозамид	8,82	2	Отрицательно заряженные ионы	325	170,9	25	289,1	13
Битионол	9,49	2	Отрицательно заряженные ионы	352,9	161	21	191,8	25

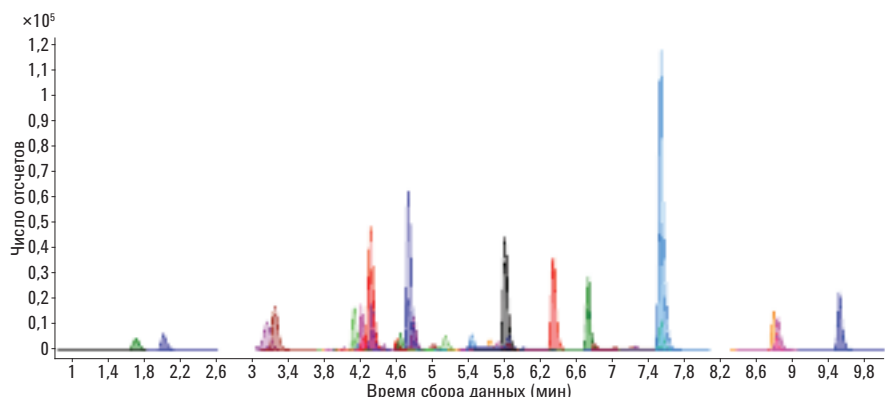


Рис. 1. Стандартная хроматограмма ЖХ-МС-МС (DMRM) пробы бычьей печени с добавлением стандарта ветеринарного препарата 50 нг/г, экстрагированной осаждением белка с последующей очисткой Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Образец готов к анализу ЖХ-МС-МС. Весь процесс пробоподготовки изображен на рис. 2.

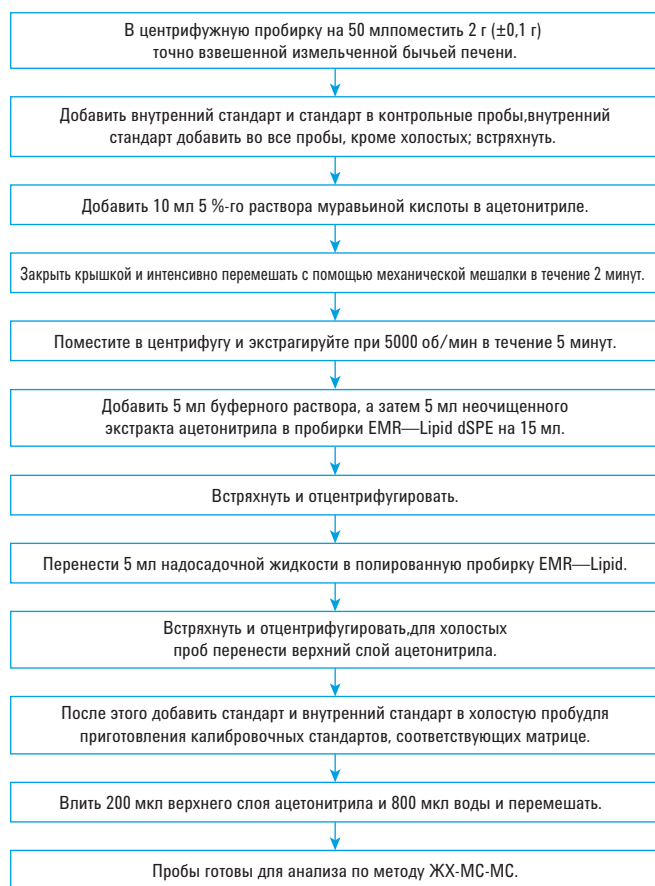


Рис. 2. Процедура пробоподготовки с помощью Agilent Bond Elut EMR—Lipid для анализа ветеринарных препаратов в бычьей печени.

Калибровочные стандарты и образцы для контроля качества

После этапа 1 предварительно разведенные образцы для КК были соответствующим образом обогащены рабочим раствором эталонного вещества для шести повторов. Для анализов G1 пробы для контроля качества соответствовали 10, 50, 250 и 750 нг/г в печени. Для анализов G2 пробы для контроля качества соответствовали 2, 10, 50 и 150 нг/г в печени. Раствор внутреннего стандарта также добавлялся во все пробы, кроме холостой пробы матрицы, соответствующей 200 нг/г флуниксин-3 в печени.

Подобранные к матрице калибровочные стандарты были подготовлены с помощью растворов стандарта и рабочих растворов внутреннего стандарта. Соответствующие концентрации в холостых пробах матрицы после этапа 8 соответствовали 5, 25, 50, 250, 750 и 1000 нг/г в печени (G1) или 1, 5, 10, 50, 150 и 200 нг/г в печени (G2) и 200 нг/г внутреннего стандарта в печени.

Определение количества коэкстрактивных веществ

Количество коэкстрактивных веществ определялось гравиметрическим измерением [7] для трех различных методик очистки; C18, циркониевым сорбентом и EMR—Lipid. Пробы готовились следующим образом.

1. Нагревать стеклянные пробирки в течение ~1 часа при 110 °С для удаления влаги.
2. Остудить пробирки до комнатной температуры.
3. Выполнить предварительное взвешивание пробирок.
4. Аккуратно перенести 1 мл исходного экстракта холостой пробы матрицы (без очистки) и холостые пробы матрицы с различными видами очистки, продублировав каждую из проб.
5. Высушить все пробы в CentriVar при температуре 50 °С в течение 1 часа или до полного высушивания.
6. Нагревать пробирки в течение ~1 часа при 110 °С для удаления влаги.
7. Остудить пробирки до комнатной температуры.
8. Выполнить повторное взвешивание пробирок.

Разность масс между значениями этапа 8 и этапа 3 является количеством коэкстрактивных веществ в пробе. Количество коэкстрактивных веществ, извлеченных посредством очистки, представляло собой среднее значение разности в массах коэкстрактивных веществ матрицы перед и после очистки.

Оценка влияния матрицы

Эффект хроматографической матрицы определялся посредством экспериментов по экстрагированию веществ, прошедших через колонку. Холостые пробы матрицы вводились посредством одновременного экстрагирования веществ, прошедших через колонку, 10 ppb раствора точного стандарта ветеринарного препарата со скоростью 60 мкл/мин. В течение всего цикла ЖХ осуществлялся мониторинг переносов соединений.

Кроме того, сравнивался отклик аналита (область пика) для экстрактов печени после добавления и точными растворами эквивалента. Экстракты печени после добавления получались посредством добавления стандартного раствора в экстракт холостой пробы матрицы печени. Разница в отклике (площади пика) напрямую связана с влиянием матрицы.

Оптимизация, валидация и сравнение метода

Использовались различные оптимизационные тесты; 5 % муравьиной кислоты в ацетонитриле в сравнении с 1% муравьиной кислоты в ацетонитриле для осаждения белка, буферный раствор ацетата аммония по сравнению с водой для очистки EMR—Lipid и с/без полировочных солей после очистки EMR—Lipid. Результаты оценивались на основании извлечения аналита, воспроизводимости и других количественных параметров. Конечный оптимизированный метод затем был валидирован посредством анализа полной количественной серии с дублированными стандартами калибровочной кривой, ограничивающими все пробы для контроля качества.

Сравнительные данные по извлечению собирались посредством проб печени до и после добавления при 50 нг/г. Экстракты обрабатывались с помощью приемлемых протоколов очистки. Для протокола EMR—Lipid с осаждением белка применялась процедура очистки, описанная на

рис. 2. Для QuEChERS, C18 или циркониевого сорбента дТФЭ использовалась следующая процедура очистки.

1. Отвесить 2 г печени в пробирку на 50 мл.
2. Добавить 8 мл фосфатного буфера (pH 7.0) и 10 мл подкисленного ацетонитрила (5% муравьиной кислоты).
3. Перемешать пробу в течение 30 с.
4. Добавить соли EN для разделения/экстракции и интенсивно встряхнуть в механическом шейкере.
5. Поместите в центрифугу и экстрагируйте при 5000 об/мин в течение 5 минут.

Неочищенный экстракт печени в ацетонитриле, используемый для дополнительной очистки, готовился следующим образом.

1. Добавить 1 мл неочищенного экстракта печени в ацетонитриле во флакон на 2 мл, содержащий 25 мг C18 и 150 мг $MgSO_4$ (каталожный номер 5982-4921), или во флакон на 2 мл, содержащий 100 мг циркониевого сорбента
2. Закрыть крышкой и перемешивать в течение 1 минуты.
3. Поместить в центрифугу и экстрагировать при 13000 об/мин в течение 3 минут (микроцентрифуга).
4. Переместить надосадочную жидкость объемом 200 мкл в другой флакон с 800 мкл воды.
5. Перемешать и отфильтровать через фильтр из регенерированной целлюлозы толщиной 0,45 мкм.

Затем пробы готовы для анализа по методу ЖХ-МС-МС. Извлечение рассчитывалось по соотношению областей пиков аналита из проб до и после добавления.

Результаты и обсуждение

Количество коэкстрактивных веществ

В таблице 3 показаны результаты гравиметрического испытания коэкстрактивных веществ пробы, которое ясно демонстрирует, что EMR—Lipid dSPE обеспечивает наибольшую эффективность очистки матрицы по весу, чем дТФЭ с C18 или циркониевым сорбентом.

Таблица 3. Результаты гравиметрического испытания коэкстрактивных веществ матрицы бычьей печени для очистки с помощью Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid, циркониевого сорбента и C18.

Методика очистки	Коэкстрактивные вещества на 1 мл конечного экстракта ацетонитрилом (мг) (n = 2)	Эффективность удаления коэкстрактивного вещества матрицы при очистке (%)
Без последующей очистки	12,1	—
EMR—Lipid dSPE	5,3	56,2
Разделение цирконием с дТФЭ	6	50,4
C18 дТФЭ	7,8	35,5

Оценка влияния матрицы

Экстрагирование после колонки (ПХИ) стандартов ветеринарных препаратов использовалось для оценки эффектов матрицы в сырых экстрактах ацетонитрила и трех конечных экстрактах ацетонитрила, очищенных EMR—Lipid, C18 и циркониевым сорбентом. В течение всего цикла ЖХ осуществлялся мониторинг аналитов. Хроматограммы ПХИ отражают влияние матрицы на аналиты, мониторинг которых проводился при регистрации положительных и отрицательных ионов. Конечный экстракт ацетонитрила не разбавлялся перед вводом, ацетонитрил вводился напрямую. Профили ПХИ представлены на рис. 3.

Как отмечено красной линией, значительная супрессия матрицы (нижняя базовая линия) и увеличение матрицы (большие пики) наблюдались при вводе неочищенной холостой пробы матрицы печени без очистки. Эти эффекты матрицы оказывают значительное негативное влияние на надежность метода и качество данных. Для сравнения, как показано синей линией, использование очистки EMR—Lipid позволяет добиться существенных улучшений, что подтверждает пониженная супрессия и увеличение матрицы.

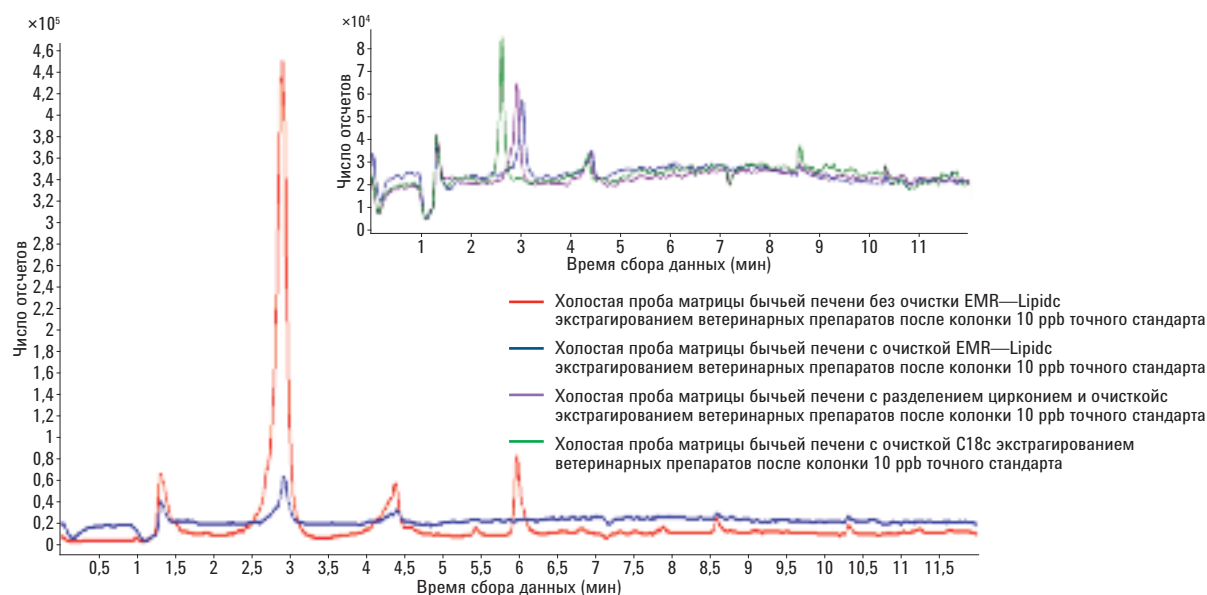


Рис. 3. Профили экстрагирования после колонки были сформированы посредством ввода холостой пробы бычьей печени с одновременным экстрагированием после колонки 10 ppb стандартного раствора ветеринарного препарата. Осуществлялся мониторинг всех аналитов для хроматографического анализа, и профиль являлся объединенной хроматограммой всех контролируемых переходов аналита.

На хроматограмме (рис. 3) показаны профили ПХИ с вводом холостых проб матрицы с использованием различных видов очистки. Профили EMR—Lipid (синий) и циркониевого сорбента (фиолетовый) похожи друг на друга. Профиль очистки C18 (зеленый) также демонстрирует сходство с двумя другими, но имеет большее количество областей увеличения матрицы и супрессии. Это сравнение соответствует результатам гравиметрии коэкстрактивных веществ, когда очистка EMR—Lipid позволяет добиться чуть более высокой эффективности, чем при использовании циркониевого сорбента, и оба сорбента обеспечивают лучшую очистку, чем C18.

Для оценки эффекта матрицы также применялось сравнение откликов аналитов проб матрицы после добавления и точных стандартов. В случае с большинством аналитов существенных различий в откликах не наблюдалось. Однако для поздно элюирующих соединений, обладающих большей гидрофобностью, более существенная ионная супрессия матрицы наблюдалась в пробах, очищенных C18 и циркониевым сорбентом. Поскольку большинство помех отличается поздним элюированием, пониженная ионная супрессия матрицы гидрофобных аналитов подтверждает, что EMR—Lipid эффективно удаляет коэкстрактивные жиры по сравнению с дТФЭ C18 и циркониевым сорбентом. На рис. 4 представлены два примера снижения эффекта ионной супрессии матрицы EMR—Lipid

Оптимизация метода

Также был исследован растворитель, используемый на этапе осаждения белка. Известно, что ацетонитрил эффективно осаждает белки при соотношении пробы и органического вещества от 1:3 до 1:5 и ацетонитрил позволяет добиться лучшего осаждения белка. Бычья печень является сложной матрицей, и извлечение белков не только чрезвычайно важно для извлечения матрицы, но и способствует эффективной очистке EMR—Lipid. В этом исследовании 1% и 5% муравьиной кислоты в ацетонитриле оценивались на этапе осаждения белка с последующей очисткой EMR—Lipid и анализом ЖХ-МС-МС. Применение 5% муравьиной кислоты в ацетонитриле позволило добиться большей воспроизводимости, что подтверждают калибровочные кривые (рис. 5). Также сравнивались извлечения аналита, и вновь 5% муравьиной кислоты в ацетонитриле позволяло добиться большей воспроизводимости.

Важным моментом является добавление дополнительного количества воды или буферного раствора для активации материала EMR-Lipid. Это позволяет улучшить его взаимодействие с нежелательной матрицей пробы, особенно жирами, что способствует эффективному извлечению матрицы. Было исследовано влияние использования буферного раствора ацетата аммония (5 мМ) во время очистки EMR—Lipid, и выполнено сравнение результатов с опытом применения воды. В целом использование буферного раствора ацетата аммония позволило улучшить многие извлечения аналита на 5-10%, кроме тетрациклинов.

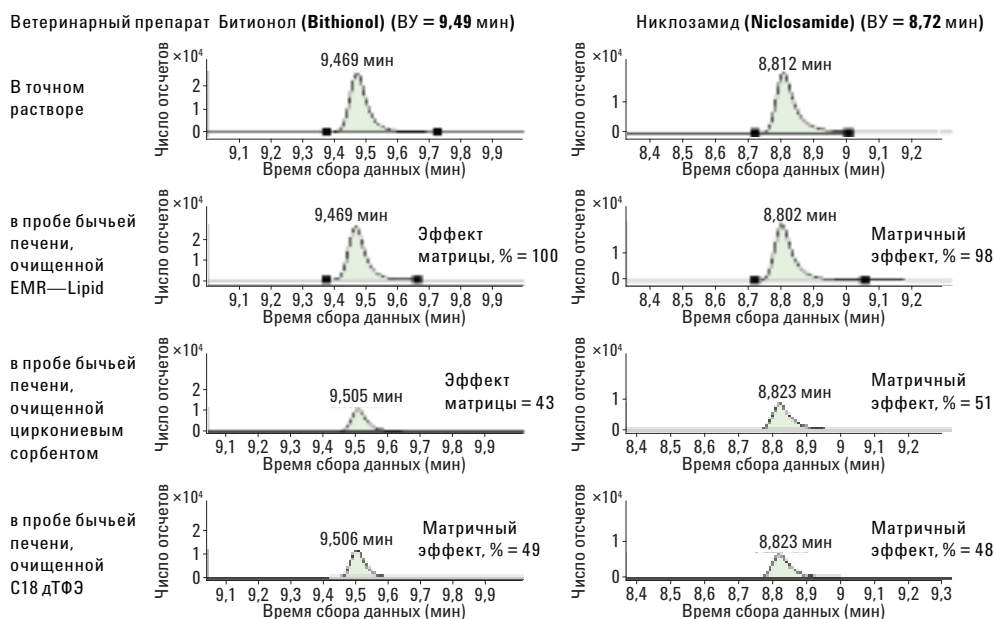


Рис. 4. Эффект ионной супрессии матрицы для гидрофобных аналитов. Матричный эффект рассчитывался из соотношения области пика в экстракте печени после добавления и соответствующем точном стандарте.

Растворитель, используемый в экстрагировании
с осаждением белка

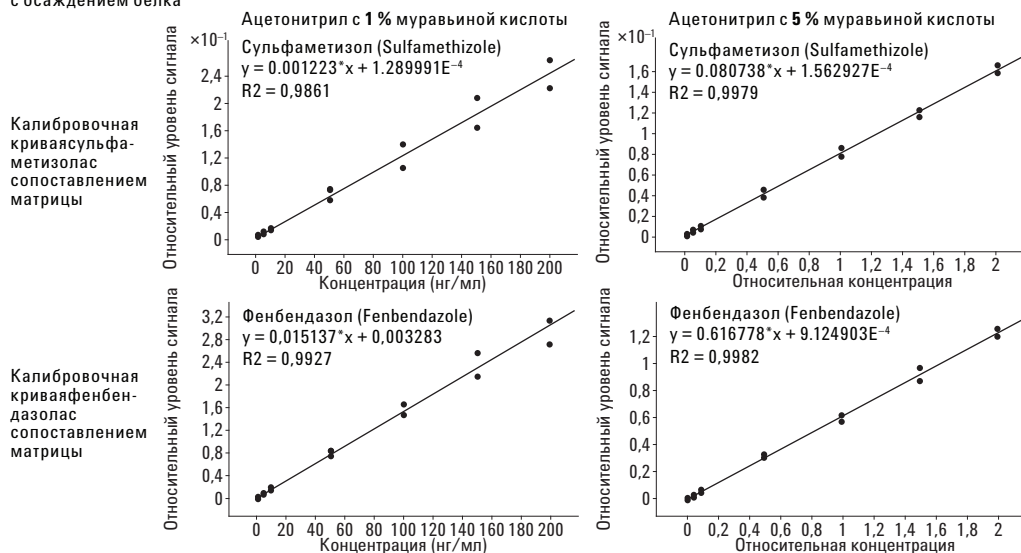


Рис. 5. Сравнение линейности калибровочной кривой при использовании 1% муравьиной кислоты в ацетонитриле и 5% муравьиной кислоты в ацетонитриле для осаждения белка.

В случае с этими соединениями использование буферных растворов привело к снижению извлечений примерно на 5% по сравнению с применением воды без буфера. Аналиты с существенными различиями в извлечениях с применением буферного раствора и воды были выбраны для сравнения, результаты которого приведены на рис. 6.

Поскольку при использовании буферного раствора улучшилось большее количество извлечений аналита, потеря тетрациклина, вызванная применением буфера, была минимальной, в последующих исследованиях использовался буферный раствор ацетата аммония 5.

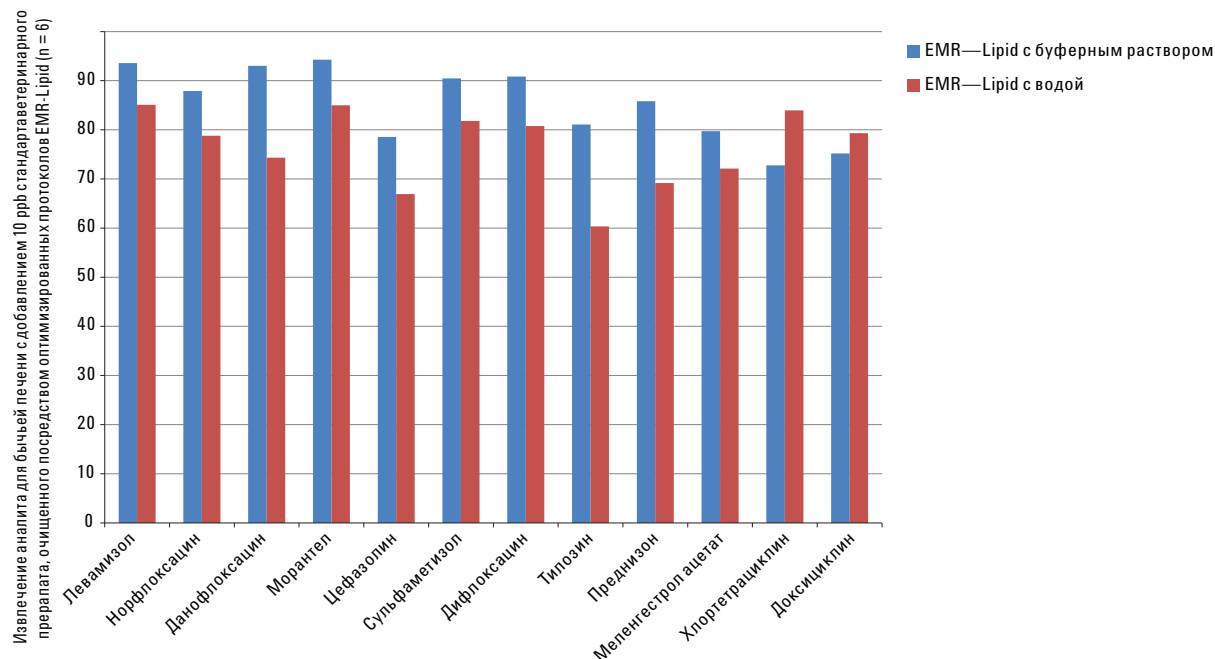


Рис. 6. Сравнение извлечения аналита при использовании 5 mM буферного раствора ацетата аммония и воды на этапе очистки Enhanced Matrix Removal dSPE.

После очистки EMR-Lipid надосадочная жидкость представляет собой смесь ацетонитрила с водной смесью с примерным соотношением 1:1. Аликвота 5 мл надосадочной жидкости затем переносится в пропированную пробирку EMR—Lipid, содержащую 2 г смеси солей (4:1 $\text{MgSO}_4:\text{NaCl}$), для разделения органической и водной фаз посредством солевого разделения. Этот этап не только позволяет добиться разделения, но также способствует дальнейшей очистке матрицы и извлечению других растворенных сорбентов и солей. Поэтому этот этап настоятельно рекомендуется для анализов ГХ и ВЭЖХ. В процессе нашей разработки методов были достигнуты высокие извлечения аналитов и воспроизводимость для всех аналитов, кроме тетрациклинов. Прибегнув к дополнительным исследованиям, мы обнаружили, что низкие извлечения тетрациклина (от 45 до 68%) были связаны с этапом солевого разделения. Для снижения потери тетрациклина был исследован альтернативный протокол (рис. 7), в котором не используются полированные соли EMR—Lipid. Процедура является схожей, за исключением того, что 400 мкл экстракта (из EMR—Lipid dSPE) и 600 мкл воды смешиваются во флаконе микроцентрифуги и перемешиваются вращательными движениями в течение одной минуты без использования этапа полирования. Пробы помещались в центрифугу и экстрагировались при 13000 об/мин в течение трех минут, а затем надосадочная жидкость переносилась во флакон на 2 мл для анализа ЖХ-МС-МС. Последующее добавления стандартов и внутренних стандартов в холостую пробу матрицы проводилось перед этапом смешивания/разбавления. В этом протоколе не использовалось солевое разделение.

Результаты, представленные на рис. 8, ясно демонстрируют, что этот альтернативный протокол позволяет существенно улучшить извлечения тетрациклинов. Однако приемлемыми могут быть и результаты при использовании протокола полирования для тетрациклинов (как показано на рис. 2), поскольку воспроизводимость играет роль при количественном определении. Низкие значения извлечений можно скорректировать посредством использования стабильного маркированного внутреннего стандарта. В этом исследовании мы разделили экстрагированные пробы для альтернативного протокола без полирования после очистки EMR—Lipid и привели три результата анализов тетрациклинов (окситетрациклин, хлортетрациклин и доксициклин) из альтернативного протокола.

Сравнение методов

Затем было выполнено сравнение оптимизированного метода EMR-Lipid с традиционным методом QuEChERS с очисткой C18 dSPE и очисткой циркониевым сорбентом. Метод QuEChERS часто используется для извлечения аналита или остаточных количеств веществ и включает этап очистки дТФЭ. На рис. 9 представлены статистические результаты сравнения извлечений, а на рис. 10 — сравнение выбранных проблематичных аналитов. Оптимизированный протокол EMR—Lipid обеспечивает значительные улучшения извлечений и воспроизводимости проблемных аналитов, особенно это касается циркониевого сорбента, дающего низкие извлечения для классов фторхинолоов и тетрациклинов. Только окситетрациклин и никлозамид обеспечивают абсолютные извлечения 67 % и 68% соответственно. Однако воспроизводимость этих двух соединений для шести повторных опытов была приемлемой с ОСО 12,8% и 2% соответственно, что считается приемлемым согласно руководству SANCO

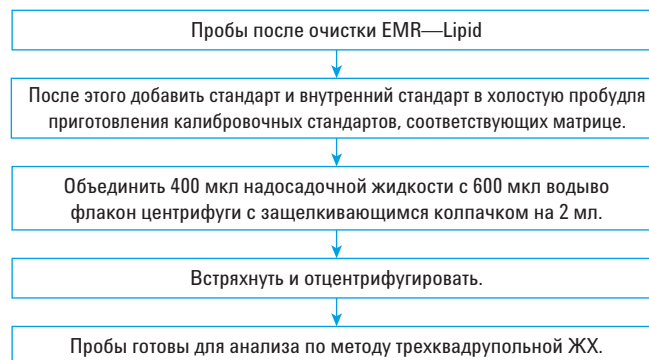


Рис. 7. Дополнительная процедура после очистки Agilent Bond Elut EMR—Lipid для улучшения извлечения тетрациклина.

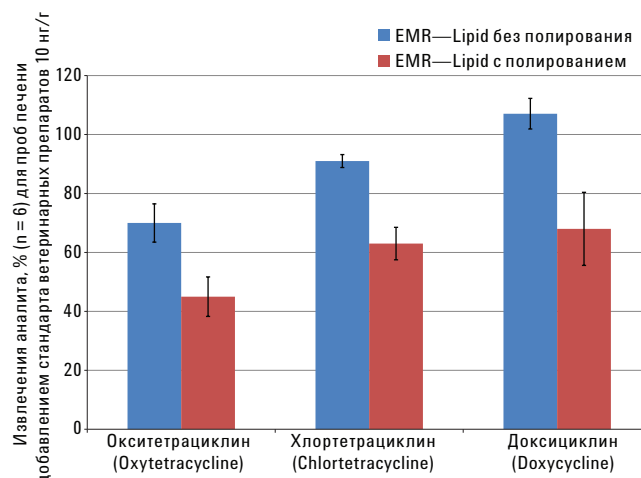


Рис. 8. Сравнение извлечения тетрациклина и воспроизводимости для проб печени, приготовленных с этапом полирования и без него с последующей очисткой посредством Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

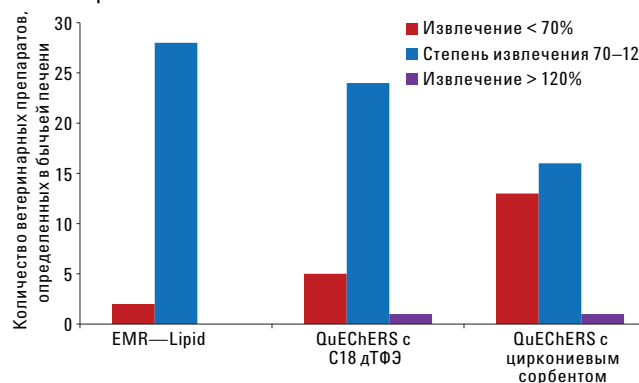


Рис. 9. Статистические результаты извлечения для сравнения протокола Agilent Bond Elut EMR—Lipid с традиционными протоколами QuEChERS.

(Генерального директората по здоровью и защите прав потребителя) [9]. Эти результаты превосходят результаты двух других протоколов, применяющих дТФЭ с C18 и циркониевыми сорбентами.

Валидация методики

Оптимизированный метод EMR—Lipid был валидирован посредством осуществления полного количественного анализа серии с применением метода, описанного в разделе, посвященном пробоподготовке. Внутренний стандарт (флуниксин-d₃ для регистрации положительных и отрицательных ионов) использовался для количественного определения точности и воспроизводимости. Абсолютное извлечение флуниксина-d₃ находилось в диапазоне от 90 до 100%. Поэтому точность тесно связана с абсолютными извлечениями. В таблице 4 показаны результаты

количественного определения. Обобщенные данные по точности (рис. 11) были сформированы посредством определения точности и воспроизводимости для 24 видов контроля качества на четырех различных уровнях (G1 = 10, 50, 250 и 750 ppb и G2 = 2, 10, 50, и 150 ppb; см. раздел, посвященный калибровочным стандартам) с шестью повторными анализами на каждом уровне. Приемлемые точности (от 70 до 120%) достигались для 93 % аналитов, кроме двух исключений, которые имели извлечение ниже 70% с хорошими ОСО. Значения ОСО для шести повторных опытов на каждом уровне были исключительными и составляли менее 10% для большинства соединений. Следует отметить, что рактопамин и кетопрофен были обнаружены на нижних уровнях в холостой пробе бычьей печени, что привело к изменению калибровочного диапазона.

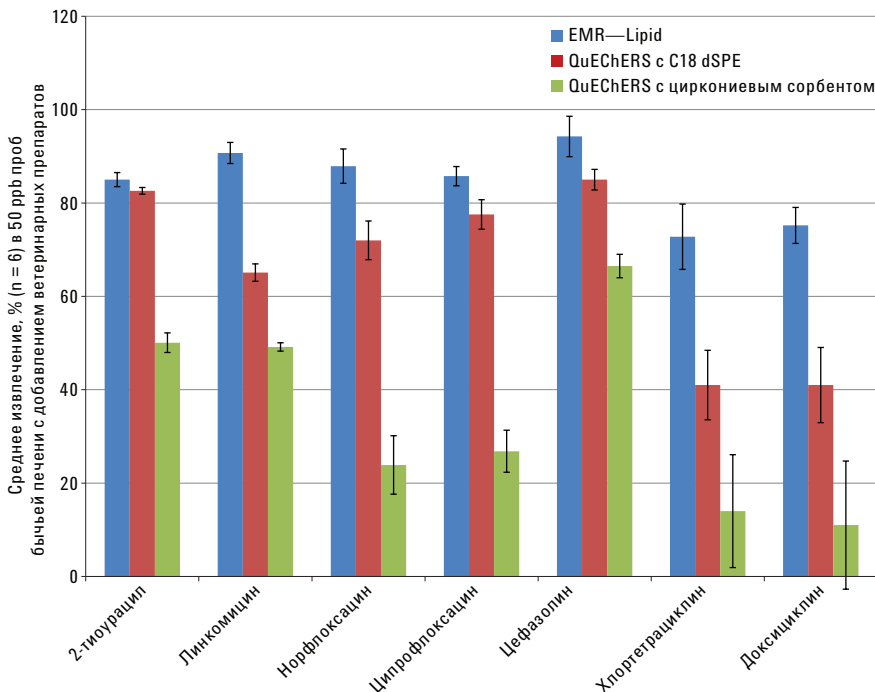


Рис. 10. Избранные результаты извлечения аналита для сравнения протокола Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid с традиционными протоколами. Результаты по хлортетрациклину и доксициклину были сформированы из альтернативного протокола, представленного на рис. 6. Для оставшихся соединений использовался протокол, показанный на рис. 1.

Таблица 4. Результаты количественного анализа целевых аналитов с использованием Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid. Каждый из аналитов оценивался на четырех уровнях концентрации для шести повторных опытов на каждом уровне.

Группа №	Аналит	Калибровочная кривая			Извлечение и воспроизводимость метода (нг/г контроль качества)											
		Регрессия/ соотношение	R ²	Диап. кал. (нг/г)	2		10		50		150		250		750	
					Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО	Извл., %	ОСО
1	2-тиоурацил	линейная, 1/х	0,9976	5-1 000	—	—	106,6	4,9	93,6	5,4	—	—	87	3	85,4	8,3
1	Амоксициллин	линейная, 1/х	0,9978	5-1 000	—	—	65,9	12,1	74,3	8,8	—	—	79,5	4,1	79,7	4,8
1	Метронидазол-ОН	линейная, 1/х	0,9981	5-1 000	—	—	92,6	15,1	89,4	6,6	—	—	89,4	3,5	89,7	3,3
1	Окситетрациклин	линейная, 1/х	0,9963	5-1 000	—	—	73,9	19,1	71,2	14	—	—	67	12,8	63,4	9
1	Цефазолин	линейная, 1/х	0,9966	5-1 000	—	—	72,1	9,4	81,2	2,7	—	—	86,7	3,8	82,9	3
1	Дифлоксацин	линейная, 1/х	0,9978	5-1 000	—	—	79	8,3	86,5	5,9	—	—	104,4	5,1	97,7	6,3
1	Хлортетрациклин	линейная, 1/х	0,9928	5-1 000	—	—	100,6	14,1	96,9	9,5	—	—	93,8	14	85	11,6
1	Доксициклин	линейная, 1/х	0,9972	5-1 000	—	—	118,9	12	102,7	10	—	—	110	7,7	104,5	8,6
1	Флорфеникол	линейная, 1/х	0,9942	5-1 000	—	—	103,4	6,2	107,9	6	—	—	115,2	13,5	107	4
1	Хлорамфеникол	линейная, 1/х	0,9962	5-1 000	—	—	103,6	6,6	107,1	7,9	—	—	113,7	9,8	100,9	5,2
1	Клозулон	линейная, 1/х	0,9954	5-1 000	—	—	77,9	10,3	104,4	6	—	—	102,2	7,1	94,3	3,3
1	Преднизон	линейная, 1/х	0,9984	5-1 000	—	—	105,9	9,1	92,1	11,1	—	—	103,9	10,5	94,5	2,3
1	Оксифенбутазон	линейная, 1/х	0,9903	5-1 000	—	—	93,6	3,4	91,9	5,2	—	—	93,7	5,6	97	4,6
1	Меленгестрол ацетат	линейная, 1/х	0,9994	5-1 000	—	—	70,6	1,4	77,3	3	—	—	82,8	2,1	77,1	2,6
1	Битионол	квадратичная,	0,9981	5-1 000	—	—	69,4	6,2	90,4	2,9	—	—	91,3	4,3	83,1	3,7
2	Левамизол	линейная, 1/х	0,9967	1-200	84,5	11,3	95,5	5,1	103,8	5,2	89,4	9,7	—	—	—	—
2	Линкомицин	линейная, 1/х	0,9950	1-200	89,5	16,4	79,6	10,6	74,1	4,5	74,8	11,2	—	—	—	—
2	Норфлоксацин	линейная, 1/х	0,9960	1-200	89,5	9,7	89,2	4,7	95,8	7,4	93,5	7,2	—	—	—	—
2	Ципрофлоксацин	линейная, 1/х	0,9980	1-200	81	5,6	83,6	6,9	96,9	4,1	99,5	5,9	—	—	—	—
2	Данофлоксацин	линейная, 1/х	0,9985	1-200	78,2	7,8	86,2	5,8	99,5	7,8	96,9	4,8	—	—	—	—
2	Рактопамин	линейная, 1/х	0,9961	10-200 ^b	—	—	98,1	15,5	105	10,4	102,5	6,8	—	—	—	—
2	Морантел	линейная, 1/х	0,9960	1-200	89,5	4,9	95,1	4,5	101	8,6	94,1	7,4	—	—	—	—
2	Сульфаметизол	линейная, 1/х	0,9928	1-200	85,7	14,6	89,2	8,1	93,9	4,9	88	10,4	—	—	—	—
2	Сульфаметоксипиридазин	линейная, 1/х	0,9973	1-200	84,7	8,1	84,4	2,9	89,9	5,7	84,9	6,2	—	—	—	—
2	Тилозин	линейная, 1/х	0,9967	1-200	80,6	11,2	75,6	2,7	71	4,5	65,3	2,3	—	—	—	—
2	Ацетопромизин	линейная, 1/х	0,9973	1-200	74,1	6,3	73,5	3	77,2	4,9	75,2	5,3	—	—	—	—
2	Хлорпромазин	линейная, 1/х	0,9967	1-200	66,1	6,1	67,8	3,8	73,4	4,3	72,7	6,5	—	—	—	—
2	Фенбендазол	линейная, 1/х	0,9988	1-200	74,6	7,7	82,3	4,6	97,9	9,9	84,9	3,5	—	—	—	—
2	Кетопрофен	линейная, 1/х	0,9978	5-200 ^c	—	—	88,3	7,2	98,1	6,9	94,5	3,8	—	—	—	—
2	Никлозамид	линейная, 1/х	0,9996	1-200	60	15,3	66,6	4,7	71,7	2	67,6	3,1	—	—	—	—

^a Аналиты группы 1 имели калибровочный диапазон от 5 до 1000 нг/г и уровни добавления для контроля качества 10, 50, 250 и 750 нг/г. Аналиты группы 2 имели калибровочный диапазон от 1 до 200 нг/г и уровни добавления для контроля качества 2, 10, 50 и 150 нг/г.

^b Калибровочный диапазон, измененный из-за обнаружения рактопамина в холостой пробе бычьей печени.

^c Калибровочный диапазон, измененный из-за обнаружения кетопрофена в холостой пробе бычьей печени.

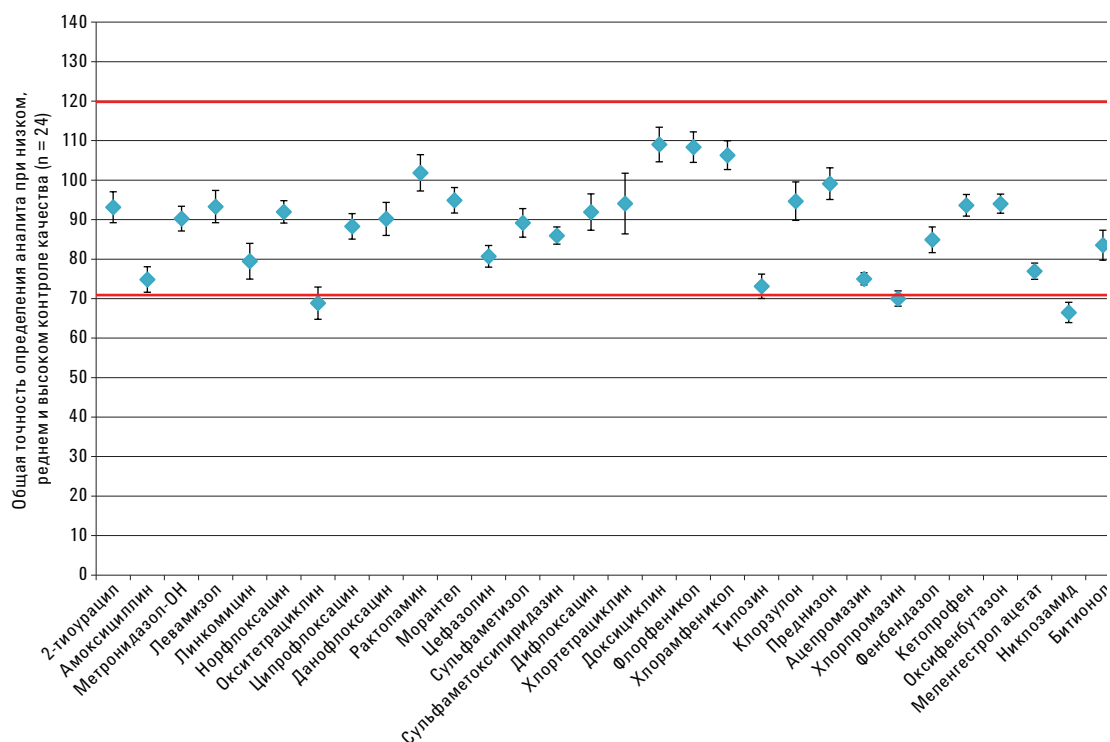


Рис. 11. Количественный анализ 30 распространенных ветеринарных препаратов в бычьей печени с помощью оптимизированного протокола Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid. Данные по точности и воспроизводимости были рассчитаны с использованием в общей сложности 24 повторов на четырех различных уровнях добавления ($n = 6$ на каждом уровне). Панель ошибки = 95% CI. Результаты по трем тетрациклиновым соединениям были сформированы из альтернативного протокола, представленного на рис. 6. Для оставшихся соединений использовался протокол, показанный на рис. 1.

Выводы

Быстрый и надежный метод с использованием осаждения белка посредством экстракции с последующей очисткой Agilent Bond Elut EMR—Lipid и полированной EMR—Lipid был оптимизирован и валидирован для анализов многокомпонентных остаточных количеств ветеринарных препаратов в бычьей печени. Эффекты матрицы внимательно оценивались и сравнивались с традиционной очисткой C18 дТФЭ и циркониевым сорбентом. Результаты показывают, что оптимизированный метод EMR-Lipid обеспечивает превосходную очистку матрицы и отличное извлечение и воспроизводимость для этого вида методики.

Необходимо отметить, что непосредственное разбавление водой использовалось перед вводом, чтобы сделать пробы восприимчивыми к ЖХ-МС-МС и сохранить целостность пиков рано элюирующих аналитов. Система ЖХ-МС-МС, использованная в этом исследовании, обеспечивала необходимую чувствительность для применения прямого разбавления пробы, но при этом отвечала требованиям по пределу

обнаружения. По сравнению с распространенным приемом высушивания и восстановления такой рабочий процесс позволил сэкономить значительное количество времени и усилий, а также предотвратил потенциальное отклонение результатов и потерю аналита. Если чувствительность инструмента не соответствует требованиям по прямому разбавлению пробы, то следует рассмотреть этап концентрации пробы в конце анализа. Это обычно достигается посредством испарения и восстановления пробы. Методика демонстрирует, что селективное извлечение матрицы с помощью EMR-Lipid обеспечивает значительные преимущества для таких комплексных проб, как бычья печень, а именно позволяет повысить чистоту проб, увеличить извлечения и воспроизводимость для анализов многокомпонентных остаточных количеств ветеринарных препаратов.

В будущем планируется исследование других комплексных матриц с высоким содержанием жира и целевых аналитов с целью демонстрации преимуществ чистых проб при использовании повышенного извлечения матрицы.

Литература

1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000*; U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC. www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm.
2. Anon. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L122, 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada, May 2012*; Health Canada, Ottawa. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf.
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, 25, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. J. *Anal. Chem.* **2005**, 5, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1202, 118-123.
7. Geis-Asteggianti, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1258, 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

Дополнительная информация

Представленные данные являются стандартными значениями. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу:
www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

Компания Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США
30 июля 2015 г.
5991-6096RU



Agilent Technologies