CH 6.19. STANOVENIE CARBADOXU A OLAQUINDOXU METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS v pozitívnom móde. Ionizácia ESI. Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio). Kvantifikácia je prevedená metódou externej kalibrácie.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na stanovenie carbadoxu a olaquindoxu v krmivách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 carbadox (CARB)
3.1.2 olaquindox (OLQ)
3.1.3 acetonitril gradient grade
3.1.4 metanol gradient grade
3.1.5 kyselina mravčia
3.1.6 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 5 mM kyselina mravčia
3.2.2 Mobilná fáza A: 5 mM kyselina mravčia
3.2.3 Mobilná fáza B: 50mM kyselina mravčia /acetonitril (10/90, v/v)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu carbadoxu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg carbadoxu (3.1.1.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.6.).

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu olaquindoxu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,4 mg olaquindoxu (3.1.2.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.6.).

Takto pripravené zásobné roztoky sa uchovávajú v chladničke pri teplote 4°C až 6°C a zostávajú stabilné po dobu troch mesiacov.

3.3.2 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.2.1 Zriedený zmesný roztok štandardov carbadoxu a olaquindoxu **ZC1** (5 mg/l vo vode)

Zobrať 0,5 ml zásobných roztokov štandardov CARB, OLQ (100 mg/l) (3.3.1.1. a 3.3.1.2). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov carbadoxu a olaquindoxu WS (0,05 mg/l)

Zobrať 100 µl zriedeného zmesného roztoku CARB a OLQ ZC1 (3.3.2.1.) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.2 chromatografická kolóna: C18
4.3 analytická váha HELAGO HM 200
4.4 minishaker Vortex
4.5 centrifúga BIOFUGE STRATOS (Heraeus)
4.6 trepačka head over head HEIDOLPH Reax 2
4.7 termovap ECOM
4.8 teflónové centrifugačné nádobky – 50 ml
4.9 laboratórne odmerné sklo: 10 a 100 ml odmerná banka, 1,5,10 ml pipety
4.10 reakčné vialky 5 ml
4.11 PP skúmavky
4.12 SPE kolónky Oasis HLB 60 mg, 3 ml
4.13 100 µl, striekačky Hamilton

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Vzorky dobre zhomogenizovať.

Do centrifugačnej teflónovej nádobky navážiť 5 g vzorky.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek (aj matricová kalibrácia)

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú na úrovniach: 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg a 0,5 mg/kg. Pridať jednotlivé roztoky štandardov a vody podľa tabuľky 1.Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.1

Tabuľka 1 Príprava fortifikovanách vzoriek

Koncentrácia carbadoxu a olaquindoxu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku ZC1 (µl)
0	0
0,05	50
0,1	100
0,2	200
0,5	500

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Extrakcia

Pridať 10 ml redestilovanej vody (3.1.6.), pretrepať. Pridať 10 ml metanolu (3.1.4.), pretrepať. Umiestniť na trepačku head over head na 20 min. nastaviť 100 ot./min. Centrifugovať 10 min. pri 3500 ot./min. Odobrať 0,5 ml supernatantu, preniesť do čistej nádobky a pridať 3,5 ml redestilovanej vody. (3.1.6.). Pokračovať prečistením na SPE kolónkach.Eluát odfúkať pod prúdom dusíka (teplota 40 ^{o}C). Reziduá rozpustiť v 1 ml 5 mM kyseliny mravčej (3.2.1.)

Poznámka: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

5.4 Chromatografická analýza

LC-podmienky:
chromatografická kolóna: C 18
teplota: 35 ^{0}C
prietok: 0,4 ml/min.
eluent: mobilná fáza A: 5 mM kyselina mravčia (3.2.2.)
mobilná fáza B: 50mM kyselina mravčia /acetonitril (10/90, v/v) (3.2.3.)
gradientová elúcia
nástrek: 50 µl

MS podmienky:

Voltages:
Capillary (kV) : 3,00
Extractor (V): 6
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 650
Cone (l/hr): 65

Analyser:
LM Resolution 1: 15
HM Resolution 1: 15
Ion Energy 1: 0,5
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 15
HM Resolution 2: 15
Ion Energy 2: 0,5

Tabuľka 2 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	Product m/z	**Cone** V	**Collision** eV
olaquindox	7,15	264,1	**143,0** 212,1	28	31 22
carbadox	8,25	263,1	**231,0** 229,0	30	13 15

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok WS. Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

<u>Kvantifikácia – metóda externej kalibrácie</u>

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Koncentráciu zložky možno vypočítať dosadením plochy píku zložky do rovnice kalibračnej krivky pre dané stanovenie .

$$c_s = \frac{A - b}{a}$$

A – plocha píku

b – úsek z rovnice kalibračnej krivky
a – smernica z rovnice kalibračnej krivky

$c_V = c_S \cdot R$ (mg/kg)

c_V - koncentrácia analytu v mg/kg
c_S - koncentrácia analytu určená z kal.krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

7 LITERATÚRA

1. Hans van Rhijn, Tina Zuidema, Compound animal feed – tylosin, virginiamycin, carbadox and olaquindox – Confirmatory analysis by LC-MS/MS, Screening and Identification Methods for official control of Banned Antibiotics and Growth promoters in Feedingstuffs, RIKILT, 2004

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC – ultraúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
MRPL – minimum required performance limit
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
e.g. - napríklad