CH 6.22. Stanovenie tetracyklínov metódou HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje 5% kyselinou trichlóroctovou. 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 vnútorného štandardu. Vnútorný štandard je demeclocyclín.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na konfirmačné stanovenie tetracyklínov v svale, mlieku, vajciach a mede.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Chlortetracycline hydrochloride (CHTC)
3.1.2 Oxytetracycline hydrochloride (OTC)
3.1.3 Demeclocycline hydrochloride (DEMTC)
3.1.4 Doxycycline hyclate (DOXTC)
3.1.5 Tetracycline (TTC)
3.1.6 metanol gradient grade
3.1.7 acetonitril gradient grade
3.1.8 pentafluoropropiónová kyselina
3.1.9 trichlóroctová kyselina
3.1.10 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 5% kyselina trichlóroctová
3.2.2 0,1% pentafluoropropiónová kyselina

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu oxytetracycline (OTC) (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,0 mg oxytetracycline hydrochloride (3.1.2.) 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 chlortetracycline (CHTC) (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,1 mg chlortetracycline hydrochloride (3.1.1.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.6.).
3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu demeclocycline (DEMTC) (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,5 mg demeclocycline hydrochloride (3.1.3.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.6.).

3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu doxycycline (DOXTC) (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,5 mg doxycycline hyclate do (3.1.4.) 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.6.).
3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu tetracycline (TTC) (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,8 mg tetracyclinu (3.1.5.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.6.).

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

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný roztok štandardu demeclocyclinu **TIS1**(1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku demeclocyclinu DEMTC (100 mg/l) (3.3.1.3.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.1.).

3.3.2.2 Základný roztok štandardu demeclocyclinu **TIS2** (0,1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 0,1 ml zásobného roztoku demeclocyclinu DEMTC (100 mg/l) (3.3.1.3.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.1.).

3.3.2.3 Základný zmesný roztok štandardov **TFC1** (1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 1 ml zásobných roztokov tetracyklínov CHTC, OTC, DOXTC, TTC (100 mg/l) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.1.).

3.3.2.4 Základný zmesný roztok štandardov **TFC2** (0,1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 0,1 ml zásobných roztokov tetracyklínov CHTC, OTC, DOXTC, TTC (100 mg/l) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou. (3.2.1.)

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov tetracyklínov – **TMC1** (10 µg/l v 5 % kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 1 ml roztoku TFC1 (3.3.2.3.) a TIS1(3.3.2.1.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.1.).

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostným detektrorom – ion trap Bruker-Gemini
4.2 kvapalinový chromatograf Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.3 chromatografická kolóna : C18

4.4 chromatografická kolóna: UPLC C18
4.5 analytická váha HELAGO HM 200
4.6 trepačka heidolph
4.7 centrifúga BIOFUGE STRATOS (Heraeus)
4.8 minishaker Vortex
4.9 teflónové centrifugačné nádobky 50 ml
4.10 laboratórne odmerné sklo:100 ml odmerné banky, 1 ml pipety
4.11 500 µl striekačka Hamilton
4.12 striekačkový mikrofilter

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorky sa dobre zhomogenizujú.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek - matricová kalibrácia

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú v 0.5, 1, 2 a 5 násobku ustanoveného MRL. V prípade medov na úrovni 0.5, 1, 2 a 5 násobku detekčného limitu.
sval:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky.Pridať 1 ml vody. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

mlieko, vajcia:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

med:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek svalu, mlieka, vajec

Koncentrácia CHTC, OTC, DOXTC, TTC vo vzorke (µg/kg)	Koncentrácia int. štandardu DEMTC vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku TFC1 (µl)	Prídavok roztoku TIS 1 (µl)
0	200	0	400
50	200	100	400
100	200	200	400
200	200	400	400
500	200	1000	400

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek medu

Koncentrácia CHTC, OTC, DOXTC, TTC vo vzorke (µg/kg)	Koncentrácia int. štandardu DEMTC vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku TFC2 (µl)	Prídavok roztoku TIS 2(µl)
0	200	0	400
10	200	200	400
20	200	400	400
40	200	800	400
100	200	2400	400

5.3 **Príprava vzorky**

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 200 µg/kg demeclocyclínu)

sval:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 1 ml vody. Pridať 400 µl roztoku TIS1 (3.3.2.1.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2
mlieko, vajce:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 400 µl roztoku TIS1 (3.3.2.1.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2
med:
Navážiť 2 g zhomogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 1 ml vody. Pridať 400 µl roztoku TIS2 (3.2.2.2.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

5.3.2 Extrakcia

Pridať 8 ml 5% kyseliny trichlóroctovej (3.2.1.). Skúmavku vložiť na 10 minút na trepačku. (nastaviť 400 ot./min) Centrifugovať po dobu 5 minút pri 14000 x g. Supernatant prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter do vialiek. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

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 HPLC

chromatografická kolóna: C18
teplota: 30 ºC
prietok: 0.6 ml/min
eluent : acetonitril / 0,1 % kyselina pentafluoropropiónová
gradientová elúcia
nástrek: 20 µl

LC-podmienky UPLC
chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 ºC
prietok: 0,3 ml/min
eluent : 0,1 % kys. mravčia v acetonitrile / 0,1 % kys. mravčia vo vode
gradientová elúcia
nástrek: 20 µl

MS podmienky LC MSD Ion Trap:
Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MRM

Tabuľka 3 Podmienky MS/MS detekcie

Name	**segment**	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Width** m/z	**Amplitude V**
oxytetracyklín	2	5,4	461	426,**443**	2	0,9
tetracyklín	3	6,1	445	410,**427**	2	0,85
demeklocyklín **IS**	4	7,2	465	430,**448**	2	0,95
chlortetracyklín	5	8,1	479	444,**462**	2	1
doxycyklín	6	8,6	445	410,**428**	2	0,95

MS podmienky Quattro Premier XE:

ionizácia:ESI pozitívna
Voltages:
Capillary (kV) : 1,42
Extractor (V): 4
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 600
Cone (l/hr): 60

Analyser:
LM Resolution 1: 13,5
HM Resolution 1: 13,5
Ion Energy 1: 1
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 13,5
HM Resolution 2: 13,5
Ion Energy 2: 0,5

Tabuľka 4 Podmienky MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
oxytetracyklín	1,94	460,9	**425,9** 443,0	25	22 14
tetracyklín	2,10	444,9	**410,0** 427,0	24	21 14
demeklocyklín **IS**	2,32	464,9	**447,9** 429,9	31	18 23
chlortetracyklín	2,58	478,9	**461,9** 443,9	32	19 21
doxycyklín	2,69	445,0	**409,9** 428,0	26	21 18

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok TMC1. Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je vyhodnotená pomocou matricovej kalibračnej krivky s korekciou na vnútorný štandard. Do kalibračnej závislosti sa vynáša na
os x: pomer koncentrácie zložky/ koncentrácie vnútorného štandardu
os y: pomer plochy zložky/plochy vnútorného štandardu

<u>Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.</u>

C koncentrácia vzorky (µg/kg)

$$C = c_1 \cdot \frac{sample\,area \cdot SI\,Sd\;c_1_area}{SI\,sample\,area \cdot Sd\;c_1_area}$$

Kvantifikácia robená na dominantné produkované ióny, ktoré sú v tabuľke 4 zvýraznené v stĺpci Product. V prípade pozitívnej vzorky je nutná kontrola iónových pomerov kvantifikačnej a kvalifikačnej tranzície. Iónový pomer musí spĺňať podmienky definované v Nariadení ES 657/2002.

7 LITERATÚRA

1. B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, Liquid-chromatography/tandem mass-spectrometry, Screening method for identification residues of antibiotics in meat, AFSSA- Agence Francaise de Securité Sanitaire des Aliments
BP 90203-35302 Fougéres cedex, France

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
MRL – maximálny reziduálny limit
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
MRM – multiple reaction monitoring
e.g. - napríklad