6.15. STANOVENIE MAKROLIDOV METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje zmesou acetonitril-voda. 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 roxithromycín.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je použiteľná na stanovenie makrolidov vo svale, mlieku, vajciach, krmive a mede a stanovenie linkosamidov a pleuromutilínov v svale a mede.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Spiramycin (SM)
3.1.2 Tylosin tartrate (TZ)
3.1.3 Josamycin (JM)
3.1.4 Erythromycin (EM)
3.1.5 Tilmicosin (TM)
3.1.6 Roxithromycin (RM)
3.1.7 metanol gradient grade
3.1.8 acetonitril gradient grade
3.1.9 pentafluoropropiónová kyselina
3.1.10 hydrogénuhličitan sodný p.a.
3.1.11 dekahydrát uhličitan sodný
3.1.12 deionizovaná voda
3.1.13 Lincomycin hydrochlorid (LM)
3.1.14 Tiamulin fumarate (TN)
3.1.15 Valnemulin (VM)

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 100 mM uhličitan sodný
3.2.2 100 mM hydrogenuhličitan sodný
3.2.3 uhličitanový pufer
3.2.4 0,1% pentafluoropropiónová kyselina
3.2.5 roztok metanol : voda, 5:95 (v/v)
3.2.6 roztok metanol : voda, 30:70 (v/v)
3.2.7 roztok metanol : voda , 1 : 1 (v/v)

3.3 **Štandardné roztoky**

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu spiramycinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,7 mg spiramycinu (3.1.1) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7).
3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu tylozínu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,6 mg tylosin tartrate (3.1.2.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7.).
3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu josamycinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg josamycinu (3.1.3) 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7.)
3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu roxithromycinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,2 mg roxithromycinu (3.1.6) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7.).
3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu erythromycinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg erythromycinu (3.1.4) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7).
3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu tilmicosinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,7 mg tilmicosinu (3.1.6) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7).
3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu lincomycinu(100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,7 mg lincomycin hydrochloride (3.1.13) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7).
3.3.1.8 Zásobný roztok štandardu tiamulinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 12,4 mg tiamulin fumarate(3.1.14) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7).
3.3.1.9 Zásobný roztok štandardu valnemulinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,3 mg valnemulinu (3.1.15) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.7).

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 zmesný roztok štandardov JM, TZ,LM, TN (2 mg/l), SM, EM (4 mg/ l), TM, VM (1 mg/l) vo vode **MFC1**
Zobrať 0,2 ml zásobných roztokov štandardov makrolidov JM,TZ,LM, TN (100 mg/l), 0,4 ml SM, EM (100 mg/l) a 0,1 ml TM,VM (100 mg/l). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.12.).

3.3.2.2 Základný zmesný roztok štandardov (TZ, JM, TM) (0,1 mg/l), (SM, EM, LM,TN,VM) (0,5 mg/l) vo vode **MFC2**
Zobrať 0,1 ml zásobných roztokov štandardov makrolidov TZ, JM, TM (100 mg/l), 0,5 ml SM, EM, LM, VM, TN (100 mg/l). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.12).

3.3.2.3 Základný roztok štandardu RM **MIS1** (2 mg/l vo vode)
Zobrať 0,2 ml zásobného roztoku štandardu RM (100 mg/l). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.12.).

3.3.2.4 Základný roztok štandardu RM **MIS2** (0,1 mg/l vo vode)
Zobrať 0,1 ml základného roztoku štandardu RM (100 mg/l). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.12.).

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov (TZ, RM, JM,TM) 5 µg/l, (SM, EM, LM,VM,TN) 25ug/l v roztoku MeOH/voda 1:1
Odobrať 0,25 ml základného roztoku štandardu RM MIS1 (2mg/l) a 5 ml zo zásobného roztoku štandardov makrolidov MFC2. Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku zmesou metanol:voda 1:1.

3.3.3.2 Zmesný roztok štandardov (SM, JM,TZ, EM, TM,LM) **MMC2** (0,02 mg/l SM, EM, 0,005 mg/l JM, TZ, TM,LM v acetonitril:voda – 3:7)
Odobrať 0,25 ml zo zásobného roztoku štandardov makrolidov JM, TZ, LM, TN (2 mg/l) a 0,5 ml zo zásobného roztoku SM, EM (4 mg/l) a TM, VM (1 mg/l). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku zmesou acetonitril: voda – 3:7.

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 pH meter KNICK
4.9 laboratórne odmerné sklo: 10 a 100 ml odmerná banka, 25 ml odmerný valec, 1 a 5 ml pipety
4.10 teflónové centrifugačné nádobky – 50 ml
4.11 25 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl striekačky Hamilton
4.12 striekačkový mikrofilter

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorka sa dobre zhomogenizuje.

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 0.5, 1, 2 a 5 násobku detekčného limitu.

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

med:
Vzorku medu skvapalniť vo vodnom kúpeli nastavenom na 60 °C. Centrifugovať 10 minút pri 2400 x g. Vosk a prípadné nečistoty usadené na povrchu odstrániť. Navážiť 5g vzorky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek (sval, vajce, mlieko, krmivo)

koncentrácia makrolidov vo vzorke (µg/kg)			koncentrácia vn. štandardu (µg/kg)	Prídavok roztoku MFC1 (µl)	Prídavok roztoku MIS1(µl)
TZ,JM, LM, TN	TM,VM	SM, EM	RM	TZ,TM,LM, SM,EM,JM, VM,TN	RM
0	0	0	200	0	200
50	25	100	200	50	200
100	50	200	200	100	200
200	100	400	200	200	200
500	250	1000	200	500	200

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek (med)

Koncentrácia makrolidov vo vzorke (µg/kg)		Koncentrácia vn. štandardu (µg/kg)	Prídavok roztoku MFC2 (µl)	Prídavok roztoku MIS2(µl)
TZ, JM,TM	SM, EM,LM, TN,VM	RM	TZ, JM	RM
0	0	4	0	200
1	5	4	50	200
2	10	4	100	200
4	20	4	200	200
10	40	4	500	200

5.3 **Príprava vzorky**

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 200 µg/kg roxithromycínu pre sval, mlieko, vajce, krmivo, 4 µg/kg roxithromycínu pre med)

sval, vajce, mlieko, krmivo:
Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 200 µl roztoku MIS1. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2
med:
Vzorku medu skvapalniť vo vodnom kúpeli nastavenom na 60 °C. Centrifugovať 10 minút pri 2400 x g. Vosk a prípadné nečistoty usadené na povrchu odstrániť. Navážiť 5g vzorky. Pridať 200 µl roztoku MIS2. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

5.3.2 Extrakcia

sval, mlieko, vajce, krmivo:
Pridať 1 ml redestilovanej vody (3.1.12.) a 8 ml acetonitrilu (3.1.8), u vzoriek vajec a mlieka pridať len 8 ml acetonitrilu (3.1.8.). Skúmavku vložiť na 10 minút na trepačku (400 ot./min.). Po pretrepaní extrakt kvantitatívne preniesť do odmerného valca a doplniť deionizovanou vodou na objem 25 ml a dokonale premiešať. Odobrať 10 ml do teflónových skúmaviek. Supernatant centrifugovať po dobu 10 minút pri otáčkach 3000 x g a teplote 15 °C. Pred meraním prefiltrovať striekačkový mikrofilter. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

med:
Pridať 10 ml uhličitanového pufru (3.2.3) a vzorku dobre zhomogenizovať. Pokračovať prečistením na SPE kolónkach.

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/mn
eluent : Metanol / Acetonitril / 0,1 % kyselina pentafluoropropiónová
gradientová elúcia
nástrek: 50 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: 10 µl

MS podmienky LC MSD Ion Trap:

Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MRM

Tabuľka 3 Podmienky MS/MS detekcie

	segment	**RT** min.	**Width** m/z	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Amplitude V**
linkomycín (linkosamid)	2	6,5 6,9	2	407	126,**359**,389	1
spiramycín	3	9,2	4	843,4	318; **540,2**; 699,2	0,65
tilmikosín		9,3	4	869,6	522,4; **696.5**;738.5	0,6
tylozín		9,6	2	916,4	318; 598,3; **772,3**	0,55
erytromycín		9,6	4	734,3	558,2; **576,2**	0,5
roxithromycín **IS**		9,7	4	837,5	558,4;**679,3**;716.4	0,45
tiamulín (pleuromutilín)		9,7	4	494,3	**192**	1,05
valnemulín (pleuromutilín)		9,8	4	565,3	**263**	0,95
josamycín		9,9	2	828,3	582,2; **600,2**	0,8

MS podmienky Quattro Premier XE:

ionizácia:ESI pozitívna
Voltages:
Capillary (kV) : 1,70
Extractor (V): 7
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
linkomycín (linkosamid)	0,93	407,0	**126,0** 359,1	34	30 20
spiramycín	2,35	843,3	**173,9** 540,1	45	38 30
tilmikosín	2,75	869,3	**173,9** 696,2	80	42 42
erytromycín	3,13	734,4	**158,0** 576,3	32	33 20
tylozín	3,24	916,2	**173,9** 772,1	56	41 30
tiamulín (pleuromutilín	3,60	494,2	**192,0** 285,2	33	20 22
roxithromycín **IS**	3,72	837,3	679,2 **157,9**	40	22 35
valnemulín (pleuromutilín)	3,81	565,2	**263,1** 164,0	28	22 34
josamycín	3,93	828,4	**174,0** 229,1	46	32 30

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok MMC. 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
2. T.S. Thompson, D.K. Noot, J. Calvert, S.F. Pernal, Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1020 (2003) 241-250

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