CH 6.23. STANOVENIE ZINC BACITRACINU 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 zinc bacitracinu v krmivách.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 bacitracin (BAC)
3.1.2 acetonitril gradient grade
3.1.3 kyselina chlorovodíková
3.1.4 acetón
3.1.5 kyselina mravčia
3.1.6 deionizovaná voda
3.1.7 metanol gradient grade

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 Extrakčný roztok
Do 1000 ml odmernej banky dať 450 ml redestilovanej vody (3.1.6.). Pridať 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1.3.) a doplniť do 1000 ml acetónom. (3.1.4.)
3.2.2 Elučný roztok SPE acetonitril/kyselina mravčia 30 mM (60/40, v/v)
3.2.3 1 M kyselina chlorovodíková
3.2.4 Mobilná fáza A: 5 mM kyselina mravčia
3.2.5 Mobilná fáza B: 50 mM kyselina mravčia /acetonitril (10/90, v/v)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu bacitracinu (1000 mg/l vo vode)
Navážiť 13,4 mg bacitracinu (3.1.1.) do 10 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve redestilovanej vody a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.6.).

Poznámka: Doba použiteľnosti zásobných štandardných roztokov je 1 mesiac od pripravenia. Zásobné štandardné roztoky uchovávať v tme pri teplote 4 – 8 ^{o}C.

3.3.2 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.2.1 Zriedený roztok štandardu bacitracinu **ZC1**
(100 mg/l vo vode)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu BAC (1000 mg/l) (3.3.1.1.) Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.6.)

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Pracovný roztok štandardu bacitracinu WS (0,1 mg/l vo vode)
Zobrať 10 µl zriedeného roztoku BAC ZC1 (3.3.2.1.) do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.6.).

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 teflónové centrifugačné nádobky – 50 ml
4.8 laboratórne odmerné sklo: 10 a 100 ml odmerná banka, 1,5,10 ml pipety
4.9 PP skúmavky
4.10 SPE kolónky
4.11 20 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 vybraných úrovniach uvedených v tabuľke 1.
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 zinc bacitracinu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku ZC1 (µl)
0	0
5	250
10	500
20	1000
50	2500

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Extrakcia

Pridať 20 ml extrakčného roztoku (3.2.1.). Poriadne ručne pretrepať. Umiestniť na trepačku head over head na 20 min., nastaviť 100 ot./min. Centrifugovať 10 min. pri 3500 ot./min.. Odobrať 400 µl supernatantu, preniesť do čistej nádobky, pridať 3,6 ml redestilovanej vody (3.1.7.). Pokračovať prečistením na SPE kolónkach. Z eluátu odobrať 50 µl. Pridať 1,5 ml vody. 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:
chromatografická kolóna: C18
teplota: 35 ^{0}C
prietok: 0,3 ml/min.
eluent: mobilná fáza A: 5 mM kyselina mravčia (3.2.4.)
mobilná fáza B: 50mM kyselina mravčia /acetonitril (10/90, v/v) (3.2.5.)
gradientová elúcia
nástrek: 20 µl

MS podmienky:
Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MRM

Tabuľka 2 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

Name	**segment**	**RT** min	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Width** m/z	**Amplitude** V
Bacitracin	2	10,8	712	356,554, 613, **669**	4	0,45

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

Kvantifikácia – metóda externej kalibrácie

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 - Avoparcin and Zinc Bacitracin – Confirmatory analysis by LC-MS/MS, Screening and Identification Methods for official control of Banned Antibiotics and Growth promoters in Feeding stuffs, 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