CH 7.17.

Stanovenie beta -agonistov v moči, pečeni, svale, krmive a mlieku metódou LC/MS/MS

1. URČENIE METÓDY

Metóda je určená na stanovenie nízkych koncentrácií beta - agonistov vo vzorkách moču hospodárskych zvierat (hovädzí dobytok, ošípaná, koza, ovca), svalového tkaniva, pečene hospodárskych zvierat (farmovej zveri, hydiny, rýb). Metóda v ďalej popísanom prevedení spĺňa kritériá konfirmačných metód určených na sledovanie rezíduí liečiv v biologickom materiáli, mlieku a krmivách a môže byť použitá na kvantitatívne stanovenie a konfirmáciu týchto analytov v uvedených vzorkách.

2. PRINCÍP METÓDY

Vzorky sa po homogenizácii, extrakcii, enzymatickej hydrolýze a prečistení na SPE kolónkach analyzujú multireziduálnou metódou LC/MS/MS.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- analytické váhy
- automatické pipety s nastaviteľným objemom, jednokanálové
- striekačky Hamilton
- centrifugačné skúmavky so zátkou (50 ml)
- vortex
- pH meter
- centrifúga s chladením
- koncentrátor so zdrojom dusíka
- vodná výveva
- magnetické miešadlo
- ultrazvukový kúpeľ
- trepačka
- vákuový manifold na prečistenie vzoriek cez SPE kolónky
- SPE kolónky Clean Screen Dau 500 mg, 6 ml (UCT)
- HPLC separačný modul Waters 2695
- MS detektor Quattro Premier XE
- Kolóna Zorbax SB Aq
- striekačkové filtre
- vialky s insertom
- pH indikátorové papieriky

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

štandardy:

- brombuterol
- cimaterol
- cimbuterol
- clenbuterol
- mabuterol
- mapenterol
- ractopamine
- salbutamol
- terbutalin
- zilpaterol

- cimaterol-d_7
- cimbuterol-d_9
- clenbuterol-d_6
- mabuterol-d_9
- mapenterol-d_{11}
- ractopamine-d_5
- salbutamol-d_6

Zásobné roztoky štandardov

Pripraviť zásobné roztoky jednotlivých štandardov o koncentrácii 1,0 mg/ml (roztok S0), resp. 0,1 mg/ml (S1) rozpustením odváženého množstva (s presnosťou na 0,1 mg) štandardu v metanole.

Zmesné pracovné roztoky štandardov

Pripraviť zmesné pracovné roztoky štandardov o koncentrácii 1,0 µg/ml (riedenie S3), resp. 0,1µg/ml (riedenie S4) riedením zásobných roztokov štandardov v metanole v kombinácii MIX 15, MIX 16, MIX 16 + TB, MIX ISTD.

MIX 15	MIX 16	MIX 16 + TB	MIX ISTD
clenbuterol	salbutamol	salbutamol	d_6-clenbuterol
cimaterol	zilpaterol	terbutaline	d_6-salbutamol
cimbuterol	ractopamine	zilpaterol	d_7-cimaterol
mabuterol		ractopamine	d_9-cimbuterol
mapenterol			d_9-mabuterol
brombuterol			d_{11}-mapenterol
			d_5-ractopamine

KALIBRAČNÉ KRIVKY

Fortifikácia matrice – moč **+25 µl ISTD S_3**

Tab.č.1

Zmesný štandard M 15	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**				
	0,05	**0,1**	**0,15**	**0,2**	**0,25**
	5 µl S_4	**10 µl S_4**	**15 µl S_4**	**20 µl S_4**	**25 µl S_4**
Zmesný štandard M 16	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**				
	0,50	**0,75**	**1,00**	**1,50**	**2,00**
	50 µl S_4	**75 µl S_4**	**10 µl S_3**	**15 µl S_3**	**20 µl S_3**
Terbutalin	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**				
	1,0	**1,5**	**2,0**	**2,5**	**3,0**

	10 µl S_3	**15 µl S_3**	**20 µl S_3**	**25 µl S_3**	**30 µl S_3**

<u>Fortifikácia matrice – pečeň, sval</u> **+ 50 µl ISTD S_3**

Tab.č.2

Zmesný štandard M 15	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**					
	0,2	**0,3**	**0,4**	**0,5**	**0,75**	**1,0**
	20 µl S_4	**30 µl S_4**	**40 µl S_4**	**50 µl S_4**	**75 µl S_4**	**100 µl S_4**
Zmesný štandard M 16	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**					
	1,0	**1,5**	**2,0**	**5,0**	**7,5**	**10,0**
	10 µl S_3	**15 µl S_3**	**20 µl S_3**	**50 µl S_3**	**75 µl S_3**	**100 µl S_3**
Terbutalin	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**					
	3,0	**5,0**	**7,5**	**10,0**	**15,0**	**5,0**
	30 µl S_3	**50 µl S_3**	**75 µl S_3**	**100 µl S_3**	**150 µl S_3**	**50 µl S_3**

<u>Fortifikácia matrice – krmivá, mlieko (metóda B)</u> **+ 100µl ISTD S_3**

Tab.č.3

Zmesný štandard M 15	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**				
	0,2	**0,3**	**0,4**	**0,5**	**0,6**
	40 µl S5	**60 µl S5**	**80 µl S5**	**100 µl S5**	**120 µl S5**
Zmesný štandard M 16+TB	**Výsledná koncentrácia analytu v matrici (ppb)**				
	1,0	**1,5**	**2,0**	**3,0**	**4,0**
	20 µl S4	**30 µl S4**	**40 µl S4**	**60 µl S4**	**80 µl S4**

Ostatné roztoky:

- 1M NaOH
- 1M KOH
- 1M kyselina octová
- 1M HCl
- 25% HCl
- 0,5 M fosfátový pufor, pH 3,0
  Rozpustiť 6,805 g dihydrogénfosforečnanu draselného v 90 ml redestilovanej vody pre HLPC v 100 ml odmernej banke, upraviť na pH 3,0 s 1M HCl, doplniť redestilovanou vodou po značku a dobre premiešať.

- Fosfátový pufor, pH 6,0
  Rozpustiť 13,6 g dihydrogénfosforečnanu draselného v 950 ml redestilovanej vody pre HPLC v 1000 ml odmernej banke, upraviť na pH 6,0 s 1M KOH, doplniť redestilovanou vodou po značku a dobre premiešať.

- Fosfátový pufor, pH 5,0
  Rozpustiť 13,6 g dihydrogénfosforečnanu draselného v 950 ml redestilovanej vody pre HLPC v 1000 ml odmernej banke, upraviť na pH 5,0 s 1M HCl, doplniť redestilovanou vodou po značku a dobre premiešať.

- Acetátový pufor, pH 5,0
  Rozpustiť 27 g acetátu sodného a 1,7 g kyseliny askorbovej v 900 ml redestilovanej vody pre HLPC v 1000 ml odmernej banke, upraviť na pH 5,0 s 25 % HCl, doplniť redestilovanou vodou po značku a dobre premiešať.

- Elučný roztok pre SPE
  Zmes etylacetátu a amoniaku v pomere 97:3, miešať 15 min, sonifikovať 3 min
  Roztok pripravovať vždy čerstvý tesne pred použitím.

- 0,05 M roztok mravčanu amónneho, pH 4,0 (mobilná fáza A)
  3,15 g mravčanu amónneho rozpustiť v 950 ml deionizovanej vody a upraviť na pH 4,0 s kyselinou mravčou. Doplniť redestilovanou vodou po značku, dobre premiešať, 10 min sonifikovať. Roztok pripravovať vždy čerstvý tesne pred použitím!

- Mobilná fáza B
  950 ml acetonitrilu a 50 ml 0,05 M roztoku mravčanu amónneho o pH 4,0 (mobilnej fázy A) miešať 5 min, 10 min sonifikovať.
  Doba expirácie takto pripraveného roztoku je pri laboratórnej teplote 3 mesiace.

Ďalšie chemikálie:

- Kyselina chlorovodíková, p.a.
- Kyselina mravčia, pre LC/MS
- Glukuronidáza-sulfatáza
- Dihydrogénfosforečnan draselný, p.a.
- Kyselina askorbová, p.a.
- Hydroxid draselný, p.a.
- Metanol pre HPLC
- redestilovaná voda pre HPLC
- petroléter, p.a.
- Kyselina octová, ľadová, p.a.
- Mravčan amónny, pre LC/MS
- Amoniak (32% vodný roztok)
- Acetát sodný, p.a.
- Acetonitril pre LC/MS, Sigma
- Hydroxid sodný, p.a.
- Etylacetát, p.a.
- Chloroform pre HPLC
- Butylmetyléter

4. BEZPEČNOSŤ PRI PRÁCI

Všetky extrakčné a čistiace kroky sa uskutočňujú pod ventilačným zariadením s odťahom pri použití ochranných okuliarov a rukavíc, je potrebné prísne dodržiavať Zásady pre bezpečnú prácu v chemických laboratóriách podľa STN 01 8003.

5. PRACOVNÝ POSTUP

5.1. PRÍPRAVA VZORKY

5.1.1. Extrakcia a hydrolýza – moč (plazma)

- napipetovať 10 ml vzorky moču (plazmy) do 50 ml centrifugačnej skúmavky (ak je vzorka kalná, centrifugovať ju pred pipetovaním 5 min pri 3000g, 5^0C)
- pridať 25µl vnútorného štandardu (riedenie S3)
- pridať 5 ml acetátového pufra, pH 5,0
- upraviť pH na 5,0 pomocou 1M kyseliny octovej alebo 1M NaOH
- pridať 50 µl glukuronidázy/sulfatázy
- vortexovať
- inkubovať cez noc pri (37 ± 1) ^{0}C
- ochladiť na laboratórnu teplotu a pridať 5 ml fosfátového pufra, pH 6,0
- upraviť pH na 6,0 1M KOH
- centrifugovať 10 min, 3000g, 5 ^{0}C
- odobrať supernatant a pridať k nemu 200µl metanolu, premiešať
- extrakt prečistiť na SPE kolónkach podľa postupu.

5.1.2. Extrakcia a hydrolýza – pečeň (sval)

- 10 g (s presnosťou na 1 mg) vzorky pečene (svalu) nakrájať na malé kúsky do 50 ml centrifugačnej skúmavky, pridať 50µl vnútorného štandardu
- pridať 20 ml fosfátového pufra, pH 5,0
- upraviť na pH 5,0 s 25% HCl alebo 1M KOH
- vortexovať
- inkubovať na trepačke 20 min pri (37 ± 1) ^{0}C
- homogenizovať 30s, ochladiť na laboratórnu teplotu
- centrifugovať 10 min pri 3000 rpm, 5^0C
- odobrať supernatant do druhej centrifugačnej skúmavky, k sedimentu pridať 10 ml fosfátového pufra (pH 5,0), pretrepať na vortexe, centrifugovať 10 min pri 3000 rpm, 5 ^{0}C, supernatant odobrať. Zmiešať oba supernatanty a premiešať.
- upraviť pH na hodnotu 5,0
- pridať 50 µl glukuronidázy/sulfatázy
- vortexovať
- trepať na trepačke 60 min pri (37 ± 1) ^{0}C, nechať ochladiť na laboratórnu teplotu
- upraviť na pH 6,0 s 5M KOH
- centrifugovať 10 min, 3000g, 5 ^{0}C
- odobrať supernatant a pridať k nemu 200 µl metanolu, premiešať
- extrakt prečistiť na SPE kolónkach podľa postupu
-

5.1.3. Extrakcia – mlieko (metóda B)

- napipetovať 2 ml mlieka (odvážiť s presnosťou na 0,1 mg) do 50 ml centrifugačnej skúmavky, pridať 100 µl vnútorného štandardu
- pridať 3 ml redestilovanej vody
  2 ml metanolu
  2 ml 0,5M fosfátového pufra pH 3,0
  8 ml chloroformu
- trepať na trepačke cez noc pri laboratórnej teplote
- centrifugovať 30 min pri 3000g pri laboratórnej teplote

- 4 ml supernatantu zriediť s 24 ml fosfátového pufra pH 6,0, upraviť pH na hodnotu 6,0 1M KOH, pridať 200 µl metanolu, premiešať
- extrakt prečistiť na SPE kolónkach podľa postupu

5.1.4. Extrakcia – mlieko (metóda A)

- napipetovať 2 ml mlieka (odvážiť s presnosťou na 0,1 mg) do 50 ml
- pridať 6 ml redestilovanej vody pre HPLC
  0,75 ml metanolu (100 %)
  0,25 ml 5M HCl
  2 ml chloroformu
- dobre trepať 1 h pri laboratórnej teplote
- centrifugovať 10 min pri 3000g (teplota 10 ^{0}C)
- odobrať supernatant (cca 7,4 ml)
- k supernatantu pridať 0,3 ml 5M NaOH a 6 ml terc. butylmetyléteru
- dobre trepať pri laboratórnej teplote 1h
- centrifugovať 10 min pri 3000g (teplota 10 ^{0}C)
- vymrazovať 1 h pri teplote min -20 ^{0}C
- odobrať éterovú vrstvu do sklenenej skúmavky
- ku zvyšku vzorky pridať 3 ml terc. butylmetyléteru, trepať 1 h pri laboratórnej teplote
- centrifugovať 10 min pri 3000g (teplota 10 ^{0}C)
- vymrazovať 1 h pri teplote min -20 ^{0}C
- odobrať éterovú vrstvu, spojiť s prvou odobratou, premiešať
- odpariť pod prúdom dusíka pri 65 ^{0}C do sucha
- rozpustiť v 200 µl HPLC mobilnej fázy A:B (95:5)
- centrifugovať 5 min pri 3400 g
- supernatant preniesť do vialiek s inzertom
- aplikovať na LC-MS/MS meranie

5.1.5. Extrakcia – krmivo

- 2 g (s presnosťou na 0,1 mg) krmiva odvážiť do 50 ml centifugačnej skúmavky
- pridať 100 µl vnútorného štandardu
- doplniť do 50 ml fosfátovým pufrom pH 5,0
- trepať na trepačke cez noc pri laboratórnej teplote
- upraviť pH na 6,0 s 5M KOH
- centrifugovať 30 min pri 3000g pri laboratórnej teplote
- k supernatantu pridať 200 µl metanolu a prečistiť na SPE kolónkach podľa postupu

Čistenie na SPE kolónkach (Clean Screen Dau, 500 mg, 6 ml)

- kondiciovať SPE kolónky 2 ml metanolu, 2 ml vody a 2 ml fosfátového pufra, pH 6,0 (voľne, bez vákua), pozor na vyschnutie kolónky
- naniesť supernatant
- premyť 1 ml 1M kyselinou octovou
- vysušiť kolónku za vákua 30 min
- premyť 2 ml metanolu (bez vákua)
- vysušiť kolónku za vákua 30 min
- eluovať 6 ml čerstvého elučného roztoku SPE (bez vákua) do skúmaviek
- odpariť do sucha pod prúdom dusíka pri 35 ^{0}C
- rozpustiť v 200 µl HPLC mobilnej fázy A+B (95+5)

- centrifugovať 5 min pri 3400 g
- supernatant preniesť do vialiek s inzertom
- aplikovať na LC/MS/MS meranie

5.2. PRÍPRAVA MERANIA

HPLC podmienky:

Kolóna: Zorbax SB Aq
Teplota kolóny: 27 ^{0}C
Objem nástreku : 10 µl
Prietok mobilnej fázy : 0,3 ml/min
Mobilná fáza A : 0,05 M mravčan amónny, pH 4,0
B : Acetonitril : 0,05 M mravčan amónny, pH 4,0 95:5(v/v)

MS/MS detekcia

Detektor : Quattro Premiere XE, Micromass Technologies
Iónový zdroj : ESI v pozitívnom móde
Teplota zdroja : 130^{0}C
Desolvatačná teplota : 150^{0}C
Prietok dusíka : desolvatačný 800 ml/min
cone 50 ml/min
Prietok kolízneho plynu : 0,35 ml/min

5.3. MERANIE

Používa sa matricová kalibrácia s použitím príslušných vhodných vnútorných štandardov pre jednotlivé analyty . Z každej vzorky sa robí 1 meranie, vzorky sa nastrekujú 1x.
Pri suspektných vzorkách sa analýza opakuje s dvoma paralelkami (konfirmačné stanovenie).
Po meraní 7, 8 vzoriek (prípadne častejšie) sa zaraďuje nástrek kontrolného matricového štandardu.

6. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

Obsah analytu vo vzorke sa vypočíta podľa vzorca :

$$C = (y – b) / a$$

kde
C – koncentrácia analytu vo vzorke vyjadrená v µg/kg, resp. µg/l
y – pomer plochy analytu a plochy príslušného vnútorného štandardu
b– intercept kalibračnej krivky
a – smernica kalibračnej krivky

Podľa Nariadenia 2002/657/EC sú vyžadované na konfirmáciu látok skupiny A Prílohy I Smernice 96/23/EC minimálne 4 identifikačné body. Tieto kritériá sú pre techniku LC-MS/MS splnené meraním jedného prekurzora a 2 dcérskych iónov pre každý analyt.

Ako doplňujúce kritérium je pomer plôch dvoch dcérskych iónov (primárneho a sekundárneho). Tento pomer musí byť v rozpätí ± 20 % v porovnaní s priemernou hodnotou pomerov vypočítaných z matricovej kalibrácie.

Ako ďalšie kritérium sa využíva relatívny retenčný čas, teda pomer retenčného času sledovaného analytu a retenčného času príslušného vnútorného štandardu. Rozdiel medzi relatívnym retenčným časom analytu vo fortifikovanej matrici a v analyzovanej vzorke môže kolísať do ± 2,5 %.

7. LITERATÚRA

- Confirmatory Method for the Determination of Beta-Agonists in Liver with LC-MS/MS, BVL Berlin, Version : Nr.1 of Jan.2003
- Determination of BETA-Agonists in liver, Training course, BVL Berlin, 2007
- Determination of BETA-Agonists in urine, Training course, BVL Berlin, 2007
- RIDASCREEN® Clenbuterol/Clenbuterol Fast (Milk: Method B Solid Phase Extraction)
- RIDASCREEN® Clenbuterol/Clenbuterol Fast (Milk: Method A)