CH 6.13. STANOVENIE CHINOLÓNOV METÓDOU UPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje 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 – izotopové zrieďovanie (isotopic dilution). Vnútornými štandardami sú lomefloxacín a cinkofen.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

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

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Flumequine (FLUM)
3.1.2 Nalidixic acid (NAL)
3.1.3 Oxolinic acid (OXOL)
3.1.4 Norfloxacin (NOR)
3.1.5 Ciprofloxacin (CIP)
3.1.6 Enrofloxacin (ENRO)
3.1.7 Sarafloxacin (SAR)
3.1.8 Danofloxacin (DAN)
3.1.9 2-Phenyl-4-quinoline carboxylic acid (cincophen) (CIN)
3.1.10 Lomefloxacin hydrochlorid (LOM)
3.1.11 Marbofloxacin (MAR)
3.1.12 Difloxacin hydrochlorid (DIF)
3.1.13 Sparfloxacin (SPR)
3.1.14 Enoxacin (ENOX)
3.1.15 Fleroxacin (FLR)
3.1.16 Ofloxacin (OFL)
3.1.17 metanol gradient grade
3.1.18 acetonitril gradient grade
3.1.19 pentafluoropropiónová kyselina
3.1.20 trichlóroctová kyselina
3.1.21 kyselina octová
3.1.22 síran sodný bezvodý p.a.
3.1.23 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 0,1 % pentafluoropropiónová kyselina
3.2.2 5 % kyselina trichlóroctová
3.2.3 2 % kyselina octová
3.2.4 acetonitril/ 2 % kyselina octová 16:84 (v/v)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu norfloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg norfloxacinu (3.1.4) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu ciprofloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg ciprofloxacinu (3.1.5.)do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu enrofloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg enrofloxacinu (3.1.6.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu oxolinic acid (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg oxolinic acid (3.1.3.)do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu nalidixic acid (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg nalidixic acid (3.1.2.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu flumequine (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg flumequinu (3.1.1.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu sarafloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 12,7 mg sarafloxacin hydrochloride trihydrate(3.1.7.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.8 Zásobný roztok štandardu danofloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,0 mg danofloxacinu (3.1.8.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.9 Zásobný roztok štandardu lomefloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,1 mg lomefloxacinu hydrochloridu (3.1.10.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.10 Zásobný roztok štandardu cincophenu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg cincophenu (3.1.9.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.11 Zásobný roztok štandardu marbofloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg marbofloxacinu (3.1.11.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.12 Zásobný roztok štandardu difloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 11,1 mg difloxacin hydrochloride(3.1.12.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.13 Zásobný roztok štandardu sparfloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg sparfloxacinu (3.1.13.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).

3.3.1.14 Zásobný roztok štandardu enoxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg enoxacinu (3.1.14.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.15 Zásobný roztok štandardu fleroxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,1 mg fleroxacinu (3.1.15.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).
3.3.1.16 Zásobný roztok štandardu ofloxacinu (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg ofloxacinu (3.1.16.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve metanolu a doplniť po značku metanolom (3.1.17.).

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 chinolónov (NOR, CIP, ENRO, OXOL, NAL, FLUM, SAR, DAN, MAR, DIF, SPR, ENOX, FLR, OFL) **CHFC1**
(1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 1 ml zásobných roztokov chinolónov NOR, CIP, ENRO, OXOL, NAL, FLUM, SAR, DAN, MAR, DIF, SPR, ENOX, FLR, OFL (100 mg/l) (3.3.1.1 – 3.3.1.8, 3.3.1.11 - 3.3.1.16) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

3.3.2.2 Základný zmesný roztok štandardov chinolónov (CIP, ENRO, OXOL, SAR, SPR, ENOX, FLR, OFL) **CHFC2** (1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 1 ml zásobných roztokov chinolónov CIP, ENRO, OXOL, SAR, SPR, ENOX, FLR, OFL (100 mg/l) (3.3.1.2., 3.3.1.3., 3.3.1.4, 3.3.1.7., 3.3.1.13.-3.3.1.16) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

3.3.2.3 Základný zmesný roztok štandardov chinolónov (NOR, NAL, FLUM, DIF) **CHFC3**
(5 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 5 ml zásobných roztokov chinolónov NOR, NAL, FLUM, DIF (100 mg/l) (3.3.1.1. a 3.3.1.5.,3.3.1.6., 3.3.1.12) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.)

3.3.2.4 Základný roztok štandardu danofloxacínu (DAN) **CHFC4**
(4 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 4 ml zásobného roztoku danofloxacínu (100 mg/l) (3.3.1.8.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

3.3.2.5 Základný roztok štandardu marbofloxacínu (MAR) **CHFC5**
(3 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 3 ml zásobného roztoku marbofloxacínu (100 mg/l) (3.3.1.11.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

3.3.2.6 Základný zmesný roztok štandardov chinolónov (NOR, CIP, ENRO, OXOL, NAL, FLUM, SAR, DAN, MAR, DIF, SPR, ENOX, FLR, OFL) **CHFC6**
(0,1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)
Zobrať 0,1 ml zásobných roztokov chinolónov NOR, CIP, ENRO, OXOL, NAL, FLUM, SAR, DAN, MAR, DIF, SPR, ENOX, FLR, OFL (100 mg/l) (3.3.1.1 – 3.3.1.8, 3.3.1.11-3.3.1.16) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

3.3.2.7 Základný zmesný roztok štandardov chinolónov (CIN, LOM) **CHIS** (1 mg/l v 5% kyseline trichlóroctovej)

Zobrať 1 ml zásobných roztokov chinolónov CIN, LOM (100 mg/l) (3.3.1.9. a 3.3.1.10.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5 % kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov chinolónov (NOR, CIP, ENRO, OXOL, NAL, FLUM, DAN, MAR, SAR, DIF, CIN, LOM, NOR D5, SPR, ENOX, FLR, OFL) **CHMC1** (10 µg/l v 5 % kyseline trichlóroctovej)

Zobrať 1 ml zásobného roztoku chinolónov CHFC1 (3.3.2.1.) a CHIS (3.3.2.7.) do 100 ml odmernej banky a doplniť do 100 ml 5% kyselinou trichlóroctovou (3.2.2.).

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro XE Premier
4.2 chromatografická kolóna : C18
4.3 analytická váha HELAGO HM 200
4.4 trepačka Heidolph
4.5 centrifúga BIOFUGE STRATOS (Heraeus)
4.6 minishaker Vortex
4.7 rotačná vákuová odparka (RVO) Buchi Rotavapor R-144
4.8 teflónové centrifugačné nádobky 50 ml
4.9 laboratórne odmerné sklo:100 a 1000 ml odmerné banky, 1000 ml odmerný valec, 1 a 5 ml pipety
4.10 striekačky Hamilton
4.11 erlenmayerova banky 100 ml
4.12 sklenený filtračný lievik
4.13 nerezová lyžička
4.14 sklenená vata
4.15 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.

sval:

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 1 ml redestilovanej vody (3.1.24.). 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 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 2,5 g 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 fortifikovanách vzoriek sval, mlieko, vajcia

koncentrácia chinolónov vo vzorke (µg/kg)				koncentrácia vn. štandardov CIN, LOM, vo vzorke(µg/kg)	Prídavok roztoku CHFC4, CHFC5 (µl)	Prídavok roztoku CHFC2 (µl)	Prídavok roztoku CHFC3 (µl)	Prídavok roztoku CHIS (µl)
CIP,ENRO, OXOL,SAR, SPR,ENOX, FLR,OFL	NAL, FLUM, NOR, DIF	MAR	DAN					
0	0	0	0	200	0	0	0	400
50	200	75	100	200	50	100	80	400
100	400	150	200	200	100	200	160	400
200	800	300	400	200	200	400	320	400
500	1000	750	1000	200	500	1000	400	400

Tabuľka 2 Príprava fortifikovanách vzoriek med

koncentrácia chinolónov vo vzorke (µg/kg)	koncentrácia vn. štandardov vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku CHFC 6 (µl)	Prídavok roztoku CHFC1 (µl)	Prídavok roztoku CHIS (µl)
CIP,ENRO,OXOL,NAL, SAR,DAN,MAR,DIF, NOR,FLUM,SPR, ENOX,FLR,OFL	CIN, LOM			
0	20	0	0	50
5	20	125	0	50
10	20	250	0	50
20	20	0	50	50
50	20	0	125	50

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom

5.3.1.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 200 µg/kg CIN,LOM)
sval:
Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky, pridať 1 ml redestilovanej vody (3.1.24.). Pridať 400 µl roztoku CHIS (3.3.2.7.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2.

mlieko, vajce:
Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 400 µl roztoku CHIS (3.3.2.7.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2.

5.3.1.2 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 20 µg/kg CIN,LOM)
med:
Navážiť 2,5 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 50 µl roztoku CHIS (3.3.2.7.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2.

5.3.2 Extrakcia

sval, mlieko, vajcia:
Pridať 8 ml 5% kyseliny trichlóroctovej (3.2.2.). Skúmavku vložiť na 10 minút na trepačku. (nastaviť 100 ot./min) Centrifugovať po dobu 5 minút pri 14000 x g. Supernatant prefiltrovať cez celulózový striekačkový mikrofilter do vialiek. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

med:
Pridať 5 ml redestilovanej vody, premiešať kým sa med nerozpustí. Pridať 10 ml acetonitrilu (3.1.18), umiestniť na Vortex na 30 s. Centrifugovať 5 minút pri otáčkach 2400 ot./min.. Do skleneného filtračného lievika dať naspodok vypálenú sklennú vatu na ňu lyžicu bezvodého síranu sodného (3.1.22) a lievik umiestniť do erlenmayerovej banky. Acetonitrilovú vrstvu preniesť na pripravený lievik a nechať pretiecť. Extrakciu opakovať opätovným pridaním 10 ml acetonitrilu, vortexovať 30 s, centrifugovať po dobu 5 min. pri 2400 ot./min. Acetonitrilovú vrstvu preniesť na pripravený lievik a nechať pretiecť. Spojiť obidva eluáty. Sorbent na lieviku opláchnuť 5 ml acetonitrilu (3.1.18.), pretečený objem pridať k eluátom. Zakoncentrovať na RVO na 1 ml pri teplote 55 ^{0}C. Koncentrát rozriediť do 3 ml roztokom acetonitril/ 2 % kyselina octová 16/84 (3.2.4). 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: 30 ºC
prietok: 0,3 ml/mn
eluent : 0,1 % kys. mravčia v acetonitrile/0,1 % kys. mravčia vo vode

gradientová elúcia
nástrek: 10 µl

MS podmienky:

ionizácia:ESI pozitívna

Voltages:
Capillary (kV) : 1,00
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 3 Podmienky MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
norfloxacín	1,88	320,0	**302,1** 276,1	37	21 19
marbofloxacín	1,81	363,0	**320,1** 345,1	35	16 19
enoxacín	1,83	321,0	**257,1** 277,1	31	17 15
ofloxacín	1,90	362,0	261,1 **318,1**	35	30 19
ciprofloxacin	1,93	332,0	**314,1** 288,1	35	19 18
fleroxacín	1,93	370,0	269,0 **326,1**	30	27 18
danofloxacín	1,98	358,1	**340,1** 314,1	36	23 17
lomefloxacín **IS**	2,01	352,0	**308,1**	36	16
enrofloxacín	2,08	360,1	245,0 **316,1**	35	25 19
sarafloxacín	2,29	386,0	**342,1** 368,1	35	18 22
sparfloxacín	2,31	393,1	292,1 **349,1**	35	24 20
difloxacín	2,34	400,0	299,0 **356,1**	37	31 18
kyselina oxolínová	2,97	262,0	**244,0** 216,0	40	18 29
kyselina nalídiová	3,61	233,0	**215,0** 187,0	35	15 29
flumechíne	3,72	262,0	**244,0** 202,0	35	22 35
cinkofen **IS**	4,10	250,0	**222,0** 206,0	42	30 29

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok CHMC1. 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

Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.

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. Preparation and LC/MS/MS analysis of honey for fluoroquinolones residues, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, CFSAN USA, 2006

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC – ultraúčinná 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