CH 6.6.

STANOVENIE AMFENIKOLOV METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje octanom etylnatým. Extrakt je purifikovaný extrakciou: kvapalina-kvapalina. Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS v negatívnom 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). Vnútorný štandard je chloramphenicol D-5. Kvantifikácia v prípade tiamfenikolu a florfenikolu je prevedená metódou externej kalibrácie. V prípade požiadavky na stanovenie len tiamfenikolu a florfenikolu je kvantifikácia prevedená metódou internej kalibrácie a vnútorným štandardom je chloramfenikol.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na konfirmačné stanovenie chloramfenikolu v svale, mlieku, vajciach, v moči a mede, tiamfenikolu a florfenikolu v svale a mlieku.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Chloramphenicol (CAP)
3.1.2 Chloramphenicol D5 (CAP-D5)
3.1.3 Thiamphenicol (TAM)
3.1.4 Florfenicol (FAM)
3.1.5 Florfenicol amine (FAMAM)
3.1.6 deionizovaná voda (Milli-Q-plus)
3.1.7 kyselina octová 100% p.a.
3.1.8 octan etylnatý
3.1.9 izooktán
3.1.10 octan amónny extra čistý bezvodý
3.1.11 metanol gradient grade
3.1.12 kyselina chlorovodíková p.a. 35 %
3.1.13 acetonitril gradient grade

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 5 M kyselina chlorovodíková
3.2.2 0.01 M octan amónny
3.2.3 1 M kyselina octová

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu CAP (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,2 mg chloramphenicolu (3.1.1) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.11.).

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu CAP-D5 (100 mg/l v acetonitrile)
Od výrobcu – nepripravuje sa.

3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu TAM (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,2 mg thiamfenicolu (3.1.3) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.11.).

3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu FAM (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10 mg florfenicolu (3.1.4) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.11.).

3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu FAMAM (100 mg/l v metanole)
Navážiť 10,2 mg florfenicol aminu (3.1.5) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom (3.1.10.).

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný roztok štandardu CAP – **ZC1** (1 mg/l vo vode)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu CAP (100 mg/l) (3.3.1.1). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.2 Základný roztok štandardu CAP-D5- **IS1** (1 mg/l v metanole)
Zobrať 100 µl zásobného roztoku štandardu 100 mg/l CAP-D5 do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku metanolom (3.1.10.).

3.3.2.3 Základný roztok štandardu TAM – **ZC2** (10 mg/l vo vode)
Zobrať 10 ml zásobného roztoku štandardu TAM (100 mg/l) (3.3.1.3). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.4 Základný roztok štandardu TAM – **ZC3** (1 mg/l vo vode)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu TAM (100 mg/l) (3.3.1.3). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.5 Základný roztok štandardov FAM a – **ZC4** (10 mg/l vo vode)
Zobrať 10 ml zásobného roztoku štandardu FAM (100 mg/l) (3.3.1.4) . Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.6 Základný roztok štandardu FAM – **ZC5** (1 mg/l vo vode)
Zobrať 1 ml zásobného roztoku štandardu FAM (100 mg/l) (3.3.1.4). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3 Zriedené roztoky základných štandardov

3.3.3.1 Štandard CAP- **FC1** (10 µg/l vo vode)
Zobrať 100 µl základného štandardu ZC1 (1 mg/l) (3.3.2.1). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3.2 Štandard CAP-D5 – **IS2** (50 µg/l vo vode)
Zobrať 500 µl základného štandardu IS1 (1 mg/l) (3.3.2.2). Preniesť do 10 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.4 Pracovné roztoky štandardov

3.3.4.1 Zmes štandardov CAP, TAM, FAM – **MC1** (CAP, CAP-D5 , TAM, FAM 50 µg/l v 0,01M octane amónnom (3.2.2.))
Zobrať 5 ml základného roztoku štandardu ZC1 (3.3.2.1), 500 µl základných roztokov štandardov ZC2 (3.3.2.3.), ZC4 (3.3.2.5.) a IS1 (3.3.2.2.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po rysku 0,01M octanom amónnym (3.2.2.).

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

Ovládanie prístrojov a zariadení je uvedené v ŠPP č. 1.2.01 CH

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostným detektrorom LC/ MSD Trap
4.2 kvapalinový chromatograf Waters 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
4.7 minishaker (Vortex)
4.8 Termovap
4.9 Odstredivka – Biofuge Stratos
4.10 Centrifugačné teflónové nádobky 50 ml
4.11 Sklenené reakčné nádobky 10 ml
4.12 Automatická pipeta Biohit 1000 µl
4.13 Hamilton striekačka 100 µl, 250 µl
4.14 Odmerné sklo

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

5.1.1 Mäso zhomogenizovať.
5.1.2 Mlieko premiešať.
5.1.3 Moč prefiltrovať.
5.1.4 Med premiešať.

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 MRPL, v prípade tiamfenikolu a florfenikolu MRL.

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1 a tabuľky 2. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Poznámka:
V prípade požiadavky na stanovenie amfenikolov vrátane chloramfenikolu použiť tabuľku 1.
V prípade požiadavky na stanovenie len tiamfenikolu a florfenikolu použiť tabuľku 2.

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek

konc. CAP (µg/kg)	konc. CAP-D5 (µg/kg)	konc. TAM (µg/kg)	konc. FAM (µg/kg)	prídavok FC1 (µl)	prídavok IS2 (µl)	prídavok ZC2 (µl)	prídavok ZC4 (µl)
0	3	0	0	0	120	0	0
0,15	3	25	50	30	120	5	10
0,3	3	50	100	60	120	10	20
0,6	3	100	200	120	120	20	40
1,5	3	250	500	300	120	50	100

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek

konc. TAM vo vzorke (µg/kg)	konc.FAM vo vzorke (µg/kg)	konc. CAP vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku ZC1 (µl)	Prídavok roztoku ZC2 (µl)	Prídavok roztoku ZC3 (µl)	Prídavok roztoku ZC4 (µl)	Prídavok roztoku ZC5 (µl)
0	0	50	100	0	0	0	0
25	50	50	100	0	50	0	100
50	100	50	100	0	100	20	0
100	200	50	100	20	0	40	0
250	500	50	100	50	0	100	0

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom

5.3.1.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 3 µg/kg CAP-D5)

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 120 µl roztoku IS2. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Poznámka: Použiť v prípade požiadavky na stanovenie amfenikolov vrátane chloramfenikolu.

5.3.1.2 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 50 µg/kg CAP)

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky, pridať 0,8 ml deionizovanej vody. Pridať 100 µl roztoku ZC1 Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Poznámka: Použiť v prípade požiadavky na stanovenie tiamfenikolu a florfenikolu .

5.3.2 Extrakcia

Pridať do centrifugačnej skúmavky 6 ml octanu etylnatého (3.1.7.) Trepať na trepačke 10 minút (100 rpm/min). Odstrediť (5 minút pri 14 000 g 4 ºC). Vrchnú vrstvu zliať do sklenenej reakčnej nádobky. Vysušiť pod dusíkom do sucha na Termovape pri 40 ºC.

5.3.3 Rozpustenie rezíduí

Rezíduá rozpustiť v 0,5 ml izooktánu (3.1.10.). Pridať 0,5 ml 0,01 M octanu amónneho. (3.2.2.) Roztoky pomaly a krátko premiešať na Vortexe. Odstrediť 5 minút pri 3000 g. Preniesť spodnú vrstvu do sklenených meracích nádobiek (do skleneného insertu). Nastreknúť 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 kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,6 ml/min
gradientová elúcia
nástrek: 50 µl

UPLC
chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,3 ml/min.
gradientová elúcia
nástrek: 10 µl

MS podmienky LC MSD Ion Trap:

Ionizačný mód: ESI negative
Detekčný mód: MRM

Tabuľka 3 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

name	RT (min.)	Precursor	Product	Width	Amplitude (V)
tiamfenikol	5,2	356	227,**290**	4	1,18
florfenikol	5,9	358	221,**338**	4	1,1
chloramfenikol	6	321	152,194,**257**	4	1,2
chloramfenikol D5 **IS**	6	326	**262**	4	1,2

MS podmienky Quattro Premier XE

Voltages:
Capillary (kV) : 0,5
Extractor (V): 3
RF Lens (V): 0
Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 100
Desolvation Temp (^{0}C): 450
Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 800
Cone (l/hr): 100

Analyser:
LM Resolution 1: 15
HM Resolution 1: 15
Ion Energy 1: 0,4
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 15
HM Resolution 2: 15
Ion Energy 2: 1
Multiplier: 710

Tabuľka 4 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

Name	RT min.	Precursor m/z	Product m/z	Cone V	Collision eV
tiamfenikol	1,36	354,1	**185,2** 290,3	34	22 14
florfenikol	1,51	356,1	**185,1** 119	30	19 33
chloramfenikol	1,53	320,9	**151,9** 256,9	31	17 12
chloramfenikol D5 **IS**	1,53	326,0	**157,0**	35	18

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok MC1 (1 µg/l). Skontrolovať pomer signálu k 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 tabuľkách 4 a 5 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. Bernard Delepine, LABORATOIRE DES MEDICAMENTS VETERINAIRES
LABORATOIRE COMMUNAUTAIRE DE RÉFÉRENCE
B.P. 90203 - 35302 FOUGERES Cédex
La Haute-Marche - JAVENE - 35133 FOUGERES (France)

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