CH 6.26. Konfirmačné stanovenie ionofórových a neionofórových kokcidiostatík v potravinách živočíšneho pôvodu a krmivách metódou LC/MS/MS.

1.Pôvod metódy:

-ionofórové kokcidiostatiká

Dusi G., Gamba V., Journal of Chromatography, 835 (1999), s.243-246
W. John Blanchflower, Desmond A. Rice, John T.G. Hamilton, Analyst, nov 1985.vol 110
Moran et Al.:Journal of AOAC International, vol.77, No4, 1994, str.885-890
Gerhardt G., Salisbury C.,Campbell., Food additives and contaminants, vol.12, n. 6 (1995),s.731-737
Metódy boli upravené na podmienky ŠVPÚ Košice RNDr. S. Tkáčikovou .

-neionofórové kokcidiostatiká

J. D. Kock, M. D. Smet, R. Sneyers:Determination of diclazuril in animal feed by liquid chromatography.
Metodika CRL pre rezíduá veterinárnych liečiv v Berlíne, Nemecko, Dr. Petra Gowik.

2. Princíp metódy:

- ionofórové kokcidiostatiká

Metóda je založená na extrakcii polyéterických antibiotík (monenzínu-MON, salinomycínu-SAL, narazínu-NAR, maduramycínu-MAD, semduramycínu-SEM a lasalocidu-LAS) z biologickej vzorky a následnom prečistení na SPE kolónkach Si alebo polymérového typu.

- neionofórové kokcidiostatiká

Metóda je založená na princípe extrakcie diklazurilu-DIC (obchodný názov Clinacox), nikarbazínu-NIC, halofuginónu-HAL a robenidínu-ROB a následným prečistením extraktu na tuhej fáze (SPE) s náplňou C-18 alebo polymérového typu.

3. Použité prístroje

Váhy,
Trepačka,
Centrifúga,
Ultrazvuková lázeň,
Rotačná vákuová odparka,
Centrifugačné skúmavky,
Pipety,
Polguľové banky,
Filtračné lieviky,

Filtračné papiere,
SPE kolónky C18, Si (500 mg, 3 ml), strata-X (100 mg, 6 ml)
SPE manifold,
Kvapalinový chromatograf s triple quadrupólom (Quattro Micro, Waters).

4. Zoznam chemikálií

Redestilovaná voda HPLC kvality,
Metanol g.g.,

Metanol p.a.,
N,N-dimetylformamid p.a., (DMF)
Tetrabutylamónium hydrogén p.a.,
Acetonitril g.g.,
Octan amónny p.a.,
Kyselina chlorovodíková (36-38 %),
Octan etylnatý p.a.,
Izooktán p.a.,
Ľadová kyselina octová

5. Príprava štandardov

-ionofórové kokcidiostatiká

Zásobný roztok každého kokcidiostatika sa pripraví s koncentráciou 0,5 mg/mL v metanole. Pracovný roztok sa nariedi tak, že výsledná koncentrácia každého kokcidiostatika bola 0.002, 0.005, 0.010, 0.020,0.030, 0.40, 06 mg/L v metanole.

-neionofórové kokcidiostatiká

Zásobný roztok diklazurilu sa pripraví s koncentráciou 0,5 mg/L v N,N-dimetylformamide, nikarbazínu, halofuginonu a robenidínu s koncentráciou 0,5 mg/L v metanole . Pracovné roztoky sa nariedia v metanole tak, aby po rozpustení bola ich výsledná koncentrácia 0.002, 0.005, 0.010, 0.020,0.030, 0.40, 06 mg/L .

Okyslený metanol: pripraví sa pridaním 5 ml kys. chlorovodíkovej ku 995 ml metanolu

6. Príprava vzoriek pre stanovenie :

-ionofórové kokcidiostatiká na SPE kolónke Si:

Svalovina, pečeň, oblička, tuk,vajcia:

5 g zhomogenizovanej vzorky sa extrahuje 10 ml zmesi izooktán/octan etylnatý (9/1 v/v) po dobu 30 minút Zmes sa zleje cez bezvodý síran sodný a zvyšný sediment sa ešte dva krát extrahuje 10 ml zmesi izooktán/octan etylnatý (v prípade vytvorenia sa emulzie sa extrakt preleje do centrifugačnej skúmavky a scentrifuguje 5 min pri 3000 ot/min).

SPE kolónka Si sa kondiciuje 5 ml zmesi izooktán/octan etylnatý (9/1 v/v). Na kolónku sa pripevní rezervoár a extrakt sa nechá prejsť kolónkou. Kolónka sa premyje 5 ml dichlórmetánu a vysuší cca 5 min. Analyt sa eluuje z kolónky 2 x 3 ml zmesi dichlórmetán /metanol (9/1 v/v) a odparí sa dosucha pri 40 °C . Odparok sa rozpustí v 1 ml metanolu.

-neionofórové kokcidiostatiká na SPE kolónke C18:

Živočíšne matrice (sval, pečeň, vajce):

8 g zhomogenizovanej vzorky sa zaleje 40 ml okysleného metanolu, umiestni sa na 10 min do ultrazvuku a následne vytrepáva na trepačke 30 min alebo nechá stáť cez noc. Extrakt sa centrifuguje 10 min pri 3000 ot/min, prefiltruje a zakoncentruje na rotačnej vákuovej odparke pri 35 °C na cca 10 ml. Supernatant sa rozpustí v 10 ml redestilovanej vody.

SPE kolónka C-18 sa aktivuje 3 ml metanolu, následne 5 ml vody. Na kolónku sa nanesie extrakt. Kolónka sa prepláchne 10 ml zmesi okyslený metanol/voda 65/35 v/v. Diclazuril sa z kolónky eluuje 10 ml zmesi okyslený metanol/voda 80/20 v/v. Eluát sa odparí dosucha pri 30 °C. Odparok sa rozpustí v 1 ml metanolu.V prípade potreby sa tento roztok prefiltruje cez chemicky rezistentný mikrofilter.

Príprava vzoriek pre stanovenie kokcidiostatík vedľa seba na SPE kolónke Strata-X:
Svalovina, pečeň, oblička, tuk,vajcia pre analýzu LC/MS/MS:

2 g zhomogenizovanej vzorky sa extrahuje 10 ml acetonitrilu 15 minút v ultrazvuku a následne 30 minút na trepačke. Extrakt sa scentrifugeje 10 min pri 4° C a 3000 ot/min a odparí pod dusíkom (Zymark, 55 °C). Odparok sa rozpustí v 5 ml redestilovanej vody a umiestni sa na 5 minút do ultazvuku

SPE kolónka Strata-X sa kondiciuje 3 ml metanolu, následne 3 ml vody. Extrakt sa nechá prejsť kolónkou. Kolónka sa premyje 3 ml vody a vysuší cca 5 min. Kokcidiostatiká sa eluujú z kolónky 5 ml metanolu a odparia sa na 1 ml pri 40 °C(Zymark).

krmivá:

Diklazuril

10 g zhomogenizovanej vzorky (v prípade **premixov** 1g) sa zaleje 200 ml okysleného metanolu, umiestni sa na 10 min do ultrazvuku a následne sa vytrepáva sa na trepačke 30 min

alebo nechá stáť cez noc. Extrakt sa prefiltruje a odparí na rotačnej vákuovej odparke dosucha pri 40 °C. Odparok sa rozpustí v 2 ml DMF a pridá sa k nemu 3 ml redest.vody. Pred HPLC analýzou sa tento roztok prefiltruje cez chemicky rezistentný mikrofilter a už sa ďalej neriedi.

Robenidín, Nikarbazín, Halofuginon

10 g zhomogenizovanej vzorky (v prípade **premixov** 1g) sa zaleje 200 ml okysleného metanolu, umiestni sa na 10 min do ultrazvuku a následne sa vytrepáva sa na trepačke 30 min alebo nechá stáť cez noc. Extrakt sa prefiltruje, odmeria sa objem a riedi sa **10-krát**.

Ionofórové antikokcidiká

10 g zhomogenizovanej vzorky (v prípade **premixov** 1g) sa extrahuje 50 ml zmesi metanol/voda 9/1 v/v na trepačke po dobu 60 minút. Extrakt sa prefiltruje a odmeria sa objem filtrátu, ktorý sa zapíše. Pred injektážou sa krmivá ***zriedia 500-krát*** – OKREM MADURAMYCÍNU. Krmivá na stanovenie maduramycínu sa riedia **10-krát**.

7. Podmienky stanovenia
-ionofórové kokcidiostatiká

LC system
Kolóna: C - 18 endcapped (Luna.Phenomenex 125x2, μm)
Mobilná fáza: metanol/voda/konc. kys. octová 990/99/1 v/v/v

Prietok mobilnej fázy: 0,4 ml / min
Teplota na kolóne : 40 °C
Teplota vzoriek: 10 °C
Injekovaný objem: 10 μl.
Čas analýzy: 8 min

MS/MS system
Detekcia: Triple quadrupole Quattro Micro Waters
Mód: ESI+, MRM mode

monenzín 693.4→461.3, 693.4→675.8

salinomycín	773.7→431.5, 773.7→531
narazín	787.5→431.3, 787.5→531
maduramycín	939,48→877,48, 939,48→895,5
semduramycín	895,3→833,6 895,3→851,5
lasalocid	614.3→378
Capillary (kV)	3,5
Extractor(V)	1
RF Lens (V)	0
Source temperature (°C)	100
Desolvation temperature (°C)	400
Desolvation gas flow (l/h)	600
Cone gas flow (l/h)	50

MRM	Cone (V)	Collision energy(eV)
693.4→461.3	65	55
693.4→675.8	65	45
773.7→431.5	65	50
773.7→531	65	45
787.5→431.3	70	50
787.5→531	70	45
939,48→877,48	41	55
939,48→895,5	41	55
895,3→833,6	35	36
895,3→851,5	35	42
614.3→378	55	38

-neionofórové kokcidiostatiká

LC system

Kolóna: Symmetry C - 18 (4,6x 75 mm, 3,5 μm, Waters)

Mobilná fáza: A: metanol/voda/konc. kys. octová 990/99/1 v/v/v

B: metanol/voda/konc. kys. octová 700/299/1 v/v/v

Čas	%A	%B
0	0	100
2	0	100
3,5	100	0
5,0	100	0

Prietok mobilnej fázy: 0,4 ml / min

Teplota na kolóne : 40 °C

Teplota vzoriek: 10 °C

Injekovaný objem: 10 ul.

Čas analýzy: 5 min