CH 6.14.
STANOVENIE CHLORAMPHENICOLU METÓDOU HPLC/MS/MS a UPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa extrahuje octanom etylnatým. Extrakt je purifikovaný extrakciou: kvapalina-kvapalina. Na analýzu sa použije chromatografická kolónu 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.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

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

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 deionizovaná voda (Milli-Q-plus)
3.1.2 octan etylnatý Suprasolv
3.1.3 metanol gradient grade
3.1.4 Chloramphenicol – (CAP)
3.1.5 Chloramphenicol D-5 (100 mg/l v metanole D4) - (CAP-D5)
3.1.6 kyselina chlorovodíková p.a. 35 %
3.1.7 acetonitril p.a.
3.1.8 octan amónny extra čistý bezvodý
3.1.9 kyselina octová 100% p.a.
3.1.10 izooktán Suprasolv

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 (3.1.7) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v metanole a doplniť po značku metanolom.

3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu CAP-D5 (100 mg/l v metanole D4)
Od výrobcu – nepripravuje sa.

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.

3.3.3 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, CAP-D5 – **MC1** (1 µg/l v 0,01 M octane amónnom)
Zobrať po 100 µl základných roztokov štandardov ZC1 (3.3.2.1) a IS1 (3.3.2.2.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku 0,01 M octanom amónnym (3.2.2.)

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostným detektrorom – ion trap Bruker-Gemini
4.2 kvapalinový chromatograf Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.3 chromatografická kolóna: UPLC C18
4.4 chromatografická kolóna: 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.

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

Tabuľka 1 Príprava fortifikovanách vzoriek

Koncentrácia CAP vo vzorke (µg/kg)	Koncentrácia CAP-D5 vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku FC1 (µl)	Prídavok roztoku IS2 (µl)	Prídavok redestilovanej vody (µl)
0	3	0	120	900
0,15	3	30	120	800
0,3	3	60	120	800
0,6	3	120	120	700
1,5	3	300	120	600

5.3 Príprava vzorky

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

Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 120 µl roztoku IS2 a 0,8 ml redestilovanej vody. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút.

5.3.2 Extrakcia

Pridať do centrifugačnej skúmavky 6 ml octanu etylnatého. Trepať na trepačke 10 minút (100 ot./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. 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 UPLC

chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,3 ml/min.
eluent: acetonitril, 0,01 M octan amónny
gradientová elúcia
nástrek: 10 µl

LC-podmienky HPLC

chromatografická kolóna: C18
teplota kolóny: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,6 ml/min
eluent: acetonitril, 0,01 M octan amónny
gradientová elúcia

Nástrek: 50 µl

MS podmienky Quattro Premier XE:

ionizácia:ESI negatívna

Voltages:
Capillary (kV) : 0,5

Analyser:
LM Resolution 1: 13.5

Extractor (V): 4
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

HM Resolution 1: 13.5
Ion Energy 1: 0,4
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 13.5
HM Resolution 2: 13.5
Ion Energy 2: 1
Multiplier: 710

Tabuľka 2 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
chloramfenikol	1,53	320,9	**151,9** 256,9	31	17 12
chloramfenikol D5 **IS**	1,53	326,0	**157,0**	35	18

MS podmienky LC MSD Ion Trap:

ionizácia: ESI negatívna

Nebulizer: 60 psi
Dry Gas: 10 l/min
Dry Temperature: 350 ^{0}C

Fragmentation options: default
Smart Frag: off

Tabuľka 3 Nastavenie podmienok MS/MS detekcie

Name	**segment**	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Width** m/z	**Amplitude** V
chloramfenikol	2	6	321	152,194, **257**	4	1,95
chloramfenikol D5 **IS**		6	326	**262**	4	1,85

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

<u>Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.</u>

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. B. Delepine, Chloramphenicol identification by liquid chromatography tandem mass-spectrometry, AFSSA- Agence Francaise de Securité Sanitaire des Aliments, BP 90203-35302 Fougéres cedex, France, 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