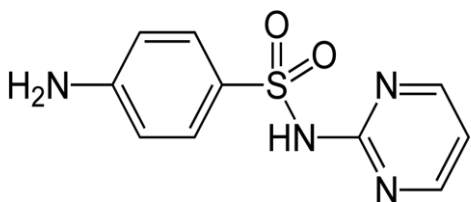
 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Revize	1

## STANOVENÍ OBSAHU SULFONAMIDŮ METODOU LC-MS/MS

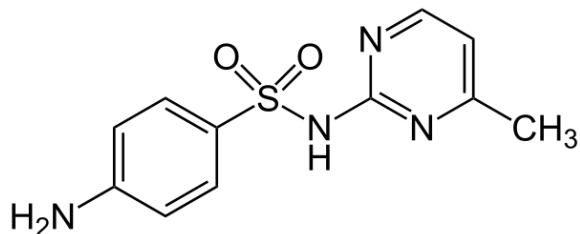
### 1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu nízkých koncentrací léčiv (Sulfadiazin, Sulfamerazin, Sulfametazin a Sulfametoxazol) v krmných směsích metodou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

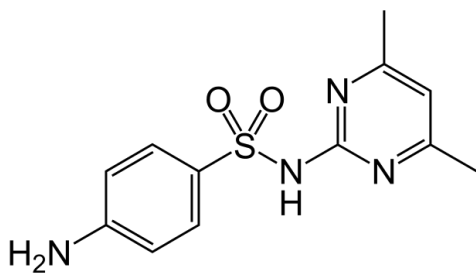
Sulfadiazin



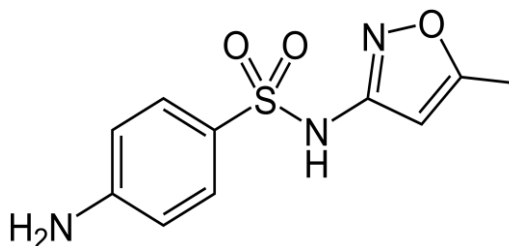
Sulfamerazin



Sulfametazin




Sulfametoxazol



### 2 Princip

Vzorky krmných směsí se extrahují methanolem. Extrakt se odstředí a vhodně naředí. LC separace probíhá na reverzní fázi C18 a MS detekce v módu sledování vybraných přechodů (MRM).

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	1

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, pro HPLC.
- 2 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 3 Kyselina mravenčí pro hmotnostní spektrometrii 98%, M<sub>r</sub> = 46,03.
- 4 Základní standardní látky.

Sulfadiazin C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S, CAS 68-35-9, M<sub>r</sub> = 250,278.

Sulfamerazin C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S, CAS 127-79-7, M<sub>r</sub> = 264,305.

Sulfametazin (Sulfadimidin) C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S, CAS 57-68-1, M<sub>r</sub> = 278,33.

Sulfametoxazol C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S, CAS 723-46-6, M<sub>r</sub> = 253,279.

- 5 Mobilní fáze A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí.


Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml ultračisté vody (2) a 1 ml kyseliny mravenčí (3), doplní se vodou (2) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

- 6 Mobilní fáze B: methanol + kyselina mravenčí.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml methanolu (1) a 1 ml kyseliny mravenčí (3), doplní se methanolem (1) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí, např. Waters Micromass Quattro Premier.
- 2 Separační kolona, např. RP C-18 Ascentis C18; 3 μm, (50 × 2,1) mm nebo jiná vhodná.
- 3 Ultrazvuková lázeň.
- 4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 5 Laboratorní třepačka (150 – 180 kmitů/s).
- 6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	1

## 5 Postup

### 5.1 Příprava standardních roztoků

#### Sulfadiazin - zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfadiazinu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfadiazin}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

#### Sulfamerazin - zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfamerazinu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfamerazin}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

#### Sulfametazin - zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfametazinu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfametazin}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

#### Sulfametoxazol - zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfametoxazolu (4), kvantitativně se převede do tmavé 50ml odměrné baňky a doplní se methanolem (1) po značku. Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{sulfametoxazol}) \doteq 0,5 \text{ g/l.}$$

#### Směsný pracovní standardní roztok I


Do 25ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství od každého jednotlivého zásobního roztoku (sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin a sulfametoxazol) tak, aby výsledná koncentrace byla 50 mg/l a doplní po značku methanolem (1). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně rok.

$$c(\text{analyt}) = 50 \text{ mg/l.}$$

#### Směsný pracovní standardní roztok II

Do 10ml odměrné baňky se odměří 2 ml směsného pracovního standardního roztoku I a doplní po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

$$c(\text{analyt}) = 10 \text{ mg/l.}$$

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	1

### Směsný pracovní standardní roztok III

Do 10ml odměrné baňky se odměří 1 ml směsného pracovního standardního roztoku II a doplní po značku methanolem (1). Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.  
 $c(\text{analyt}) = 1 \text{ mg/l}$ .

### 5.2 Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky

Do 10ml odměrných baněk se podle tabulky 1 odměří odpovídající množství směsného pracovního standardního roztoku III a doplní se asi 1 cm pod značku methanolem (1). Po promíchání a vytemperování se doplní methanolem (1) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,003 – 0,2)  $\mu\text{g/ml}$ . Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením.

Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem. Na základě kalibrační křivky vyhodnocovací program vypočte obsah analytu ve vzorcích.

**Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků do 10ml odměrných baněk.**

Odměrná baňka č.	1	2	3	4	5	6	7
Objem směsného pracovního standardního roztoku III (ml)	0,03	0,08	0,16	0,4	0,8	1,2	2,0
Koncentrace analytu ( $\mu\text{g/ml}$ )	0,003	0,008	0,016	0,040	0,080	0,120	0,200


### 5.3 Extrakce léčiv ze vzorků

Do 50ml centrifugační baňky se naváží 1 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností  $\pm 0,002 \text{ g}$  a přidá se 25 ml methanolu (1). Baňka se uzavře zátkou a třepa se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 20 min při (150 – 180) kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 20 min při teplotě 20 °C při 1500 g. Po odstředění se vytemperuje na laboratorní teplotu, naředí se podle potřeby methanolem (1) a převede se do vialky.

V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného IRM.

### 5.4 Vlastní stanovení léčiv ve vzorcích

Stanovení se provádí za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v tabulkách 2 až 4. Parametry stanovení platí pro sestavu LC-MS/MS Premium Waters a slouží jako příklad nastavení instrumentace. Tyto parametry stanovení se mohou změnit použitím jiné vhodné kolony nebo jiné přístrojové sestavy LC-MS/MS.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	1

**Tabulka 2. Chromatografické parametry stanovení - příklad.**

Kolona	RP C-18 Ascentis C18; 50 mm× 2,1 mm ×3 μm (Supelco)
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (5) a mobilní fáze B (6) podle tabulky 3
Celková doba analýzy	17 min
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Objem nástřiku	50 μl


**Tabulka 3. Příklad gradientového programu pro analýzu.**

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
0,9	100	0
1,0	90	10
7,0	80	20
10,0	0	100
13,0	100	0
15,0	100	0

Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek jsou v tabulce 4.

**Tabulka 4. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.**

Analyt	Retenční čas (min)
Sulfadiazin	4,59
Sulfamerazin	5,71
Sulfametazin (Sulfadimidin)	6,99
Sulfametoxazol	8,53

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	1

### Parametry stanovení MS


Pro identifikaci jednotlivých analytů se použije MRM mód (multiple reaction monitoring), sledování produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu [5]. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daných produktových iontů maximální, jsou uvedeny v tabulce 5. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v tabulce 6.

**Tabulka 5. Příklad parametrů MS detektoru.**

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,50 kV
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	600 l/h
Cone gas flow	50 l/h
CID gas	argon, p = 0,5 bar

**Tabulka 6. Příklad MRM parametrů pro analýzu jednotlivých analytů v krmivech.**

Prekurzorový iont (m/z)		Cone voltage (V)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Sulfadiazin	251,4	28	92,0	36
			108,0	30
			156,0	20
Sulfamerazin	264,8	28	91,9	30
			108,0	30
			156,8	25
			171,9	25
Sulfametazin (Sulfadimidin)	279,0	28	92,0	30
			108,0	30
			124,0	30
			155,85	30
			186,0	30
Sulfametoxazol	254,0	33	91,9	35
			108,0	32
			155,9	21

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10622.1 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	1

## 6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah jednotlivých léčiv ( $X$ ) vyjádřených v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

- $c$  je koncentrace léčiva ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,  
 $V$  objem extrakční směsi v ml, v tomto postupu 25 ml,  
 $m$  hmotnost zkušebního vzorku v g, v tomto postupu 1,000 g,  
 $R$  ředění, resp. zkoncentrování.

## 7 Literatura

- 1 V. Goulas, T. Anisimova Andreou, C. Angastinioti Modoto, O. Tzamaloukas: A rapid HPLC method for the determination of sulphonamides and trimethoprim in feed premixes. *Journal of animal and feed sciences*, 23 (2014) 185-189.
- 2 K. George, U. Vincent, C. von Holst: Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1293 (2013) 60 – 74.
- 3 R. Liu, P. He, Z Li, R. Li: Simultaneous Determination of 16 Sulfonamides in Animal Feeds by UHPLC-MS-MS, *Journal of Chromatography Science*, 49 (2011) 640-646.
- 4 Nařízení komise (EU) č. 574/2011 ze dne 16. 6. 2011, kterým se mění příloha I směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES, pokud jde o maximální limity dusitanů, melaminu, Ambrosia spp. a o křížovou kontaminaci určitými kokcidiostatiky a histomonostatiky, a kterým se konsolidují přílohy I a II uvedené směrnice
- 5 Rozhodnutí Komise 2002/657/EC ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků.