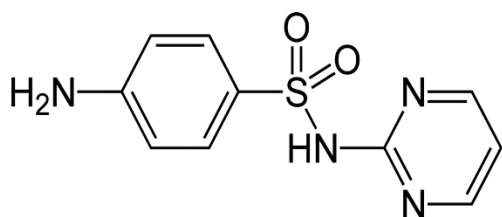
 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	2
		Revize	0

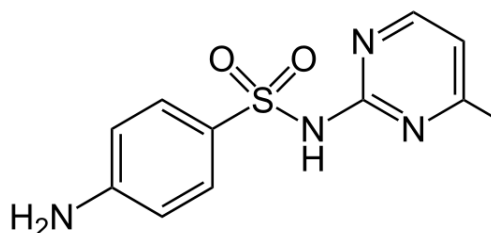
STANOVENÍ OBSAHU SULFONAMIDŮ METODOU LC-MS/MS

1 Účel a rozsah

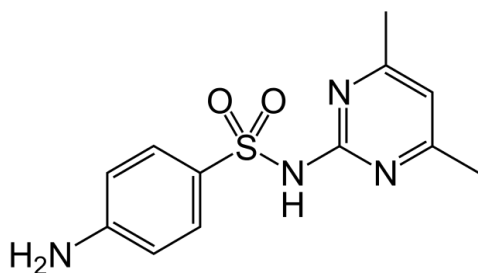
Postup specifikuje podmínky pro stanovení sulfonamidů (sulfadiazin, sulfamerazin, sulfametazin a sulfametoxazol) v krmivech metodou LC-MS/MS.



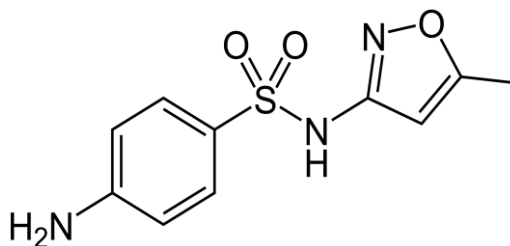
Obrázek 1. Sulfadiazin.



Obrázek 2. Sulfamerazin.



Obrázek 3. Sulfametazin.



Obrázek 4. Sulfametoxazol.


2 Princip

Vzorky krmných směsí se extrahují vodným roztokem methanolu. Naředěné extrakty se separují na reverzní fázi C18 a analyzují metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, CH₃OH, pro HPLC.
- 2 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 3 Kyselina mravenčí, HCOOH, 98%, pro hmotnostní spektrometrii.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	2
		Revize	0

4 Methanol, CH₃OH, 50% roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 500 ml methanolu (1) a 500 ml ultračisté vody (2). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

5 Základní standardní látky s deklarovanou čistotou.

Sulfadiazin C₁₀H₁₀N₄O₂S, CAS 68-35-9, M_r = 250,278.

Sulfamerazin C₁₁H₁₂N₄O₂S, CAS 127-79-7, M_r = 264,305.

Sulfametazin (Sulfadimidin) C₁₂H₁₄N₄O₂S, CAS 57-68-1, M_r = 278,33.

Sulfametoxazol C₁₀H₁₁N₃O₃S, CAS 723-46-6, M_r = 253,279.

6 Mobilní fáze A: 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě.

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. Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

7 Mobilní fáze B: 0,1% roztok kyseliny mravenčí v methanolu.

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 do vypotřebování.

4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí, např. Waters XEVO TQD.

2 Separační kolona, např. ACQUITY UPLC BEH C-18; 1,7 μm, (50 × 2,1) mm nebo jiná vhodná.

3 Ultrazvuková lázeň.

4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.

5 Laboratorní třepačka, (50 – 100) kmitů/min.

6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou.

5 Postup


Připraví se zásobní standardní roztoky všech analytů a jejich směsné pracovní roztoky.

5.1 Příprava standardních roztoků

Sulfadiazin – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfadiazinu (5), 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 půl roku.

c(sulfadiazin) ≐ 0,5 g/l.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	2
		Revize	0

Sulfamerazin – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfamerazinu (5), 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 půl roku.

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

Sulfametazin – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfametazinu (5), 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 půl roku.

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

Sulfametoxazol – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 25 mg sulfametoxazolu (5), 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 půl roku.

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

Směsný pracovní standardní roztok I

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

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

Směsný pracovní standardní roztok II

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

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


Směsný pracovní standardní roztok III

Do 10ml odměrné baňky se napipetuje 1 ml směsného pracovního standardního roztoku II a doplní se 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 50% methanolem (4). Po promíchání a vytemperování se doplní 50% methanolem (4) po značku a převede do vialek. Takto naředěné

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	2
		Revize	0

kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,003 – 0,2) mg/l. Na chromatografickou kolonu se dávkuje 2 µl kalibračního roztoku. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením. Kalibrační křivky jsou lineární a procházejí počátkem.

Lze použít i interní kalibraci u sporných vzorků s významným matričním efektem.

Tabulka 1. Příprava kalibračních standardních roztoků.

Odměrná baňka 10 ml	1	2	3	4	5	6	7
Směs.prac.standard. roztok III (ml)	0,03	0,08	0,16	0,4	0,8	1,2	2,0
Koncentrace analytu (mg/l)	0,003	0,008	0,016	0,040	0,080	0,120	0,200

5.3 Příprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

5.4 Extrakce léčiv ze vzorků


Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g zkušebního vzorku krmné směsi s přesností 0,01 g a přidá se 25 ml 50% methanolu (4). Zkumavka se uzavře a třepa se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 20 min při asi 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 20 min při 1500 g. Ze supernatantu se pipetuje do 10ml odměrné baňky vhodný alikvot podle Tabulky 2. Odměrná baňka se doplní po značku 50% methanolem (4) a po promíchání se převede do vialky. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného referenčního materiálu.

Tabulka 2. Ředění extraktů krmiv.

	Deklarace (mg/kg)	Ředění
Krmiva	< 10	10 ×
	10 – 100	100 ×
	> 100	1000 ×

5.5 Vlastní stanovení léčiv ve vzorcích

Stanovení se provádí za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v Tabulkách 3 až 5. Parametry stanovení platí pro sestavu UHPLC-MS/MS Waters XEVO TQD a slouží jako příklad nastavení instrumentace.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Revize	0

Tabulka 3. Chromatografické parametry stanovení – příklad.

Kolona	ACQUITY UPLC BEH C-18; 1,7 µm, (50 × 2,1) mm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (6) a mobilní fáze B (7) podle Tabulky 4
Celková doba analýzy	6 min
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	2 µl

Tabulka 4. Gradientový program pro analýzu.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
0,54	100	0
0,6	90	10
4,2	80	20
5,0	0	100
5,3	100	0
6,0	100	0


Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek jsou v Tabulce 5.

Tabulka 5. Retenční časy jednotlivých analytů za uvedených podmínek.

Analyt	Retenční čas (min)
Sulfadiazin	1,54
Sulfamerazin	2,03
Sulfametazin (Sulfadimidin)	2,70
Sulfametoxazol	3,53

Parametry stanovení MS

Pro identifikaci jednotlivých analytů se použije MRM mód (multiple reaction monitoring), sledování produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daných produktových iontů maximální, jsou uvedeny v Tabulce 6. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v Tabulce 7.


	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	2
		Revize	0

Tabulka 6. Příklad parametrů MS detektoru.

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,00 kV
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	450 °C
Desolvation gas flow	1000 l/h
Cone gas flow	50 l/h
CID gas	argon, p = 0,5bar

Tabulka 7. Příklad MRM parametrů pro analýzu jednotlivých analytů v krmivech.

Prekurzorový iont (m/z)		Cone voltage (V)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Sulfadiazin	251,1	28	92,0	29
			108,0	30
			156,0	20
Sulfamerazin	265,1	35	92,0	31
			108,0	27
			156,0	20
			172,0	20
Sulfametazin (Sulfadimidin)	279,1	40	92,0	35
			108,0	27
			124,0	22
			156,0	22
			186,0	18
Sulfametoxazol	254,0	33	92,0	30
			108,0	30
			156,0	18

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10622.2 – Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS	Vydání	2
		Revize	0

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

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

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

kde

- 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 g,
 R ředění, resp. zakoncentrování.

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.
- 6 ÚKZUZ JPP 10622.1 - Stanovení obsahu sulfonamidů metodou LC-MS/MS.