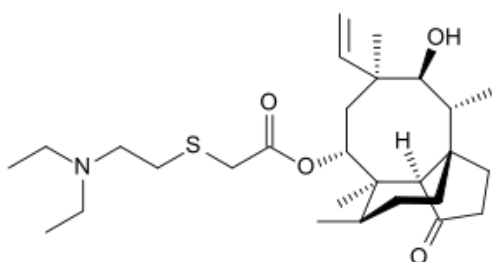
 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10638.1 – Stanovení tiamulinu metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	0

STANOVENÍ TIAMULINU METODOU LC-MS/MS

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení tiamulinu v krmných směsích metodou LC-MS/MS.



Obrázek 1. Tiamulin.

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 Acetonitril, CH₃CN, pro HPLC.
- 3 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 4 Kyselina mravenčí, HCOOH, 98 %, pro hmotnostní spektrometrii.
- 5 Methanol, CH₃OH, 90% roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml methanolu (1) a 100 ml ultračisté vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10638.1 – Stanovení tiamulinu metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	0

6 Methanol, CH₃OH, 50% roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 500 ml methanolu (1) s 500 ml ultračisté vody (3). Vzniklý roztok se promíchá, odvzdušní na ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

7 Základní standardní látka s deklarovanou čistotou.

Tiamulin, C₂₈H₄₇NO₄S, $M_r = 493.74$, CAS 55297-96-6.

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

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 900 ml ultračisté vody (3) a 1 ml kyseliny mravenčí (4), doplní se vodou (3) po značku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

9 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 (4), 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 C18; (50 × 2,1) mm × 1,7 μm.

3 Ultrazvuková lázeň.

4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.

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

6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou, 1500 g.

7 Vialky skleněné, 1,5 ml.

5 Postup


5.1 Příprava standardních roztoků

Kalibrace se provádí před každým měřením.

Tiamulin – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 2 mg tiamulinu (7) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do tmavé 10ml odměrné baňky a doplní se acetonitrilem (2) 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 6 měsíců.

$c(\text{tiamulin}) \doteq 0,2 \text{ g/l}$.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř		Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10638.1 – Stanovení tiamulinu metodou LC-MS/MS		Vydání	1
			Revize	0

Pracovní standardní roztok I

Do 10ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství zásobního roztoku tiamulinu tak, aby výsledná koncentrace byla 10 mg/l a doplní po značku methanolem (1). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní nejméně 3 měsíce.

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

Pracovní standardní roztok II

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

$c(\text{tiamulin}) = 1 \text{ mg/l}$.

5.2 Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky

Do 10ml odměrných baněk se podle Tabulky 1 odměří odpovídající množství pracovního standardního roztoku II a doplní se asi 1 cm pod značku 50% methanolem (6). Po promíchání a vytemperování se doplní 50% methanolem (6) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,003 – 0,2) mg/l. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením.

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

Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků.


Odměrná baňka 10 ml	1	2	3	4	5	6	7
Prac. standardní roztok II (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

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

5.3 Extrakce léčiv ze vzorků

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností 0,01 g a přidá se 25 ml 90% methanolu (5). Zkumavka se uzavře a třepa se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 30 min při cca 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 20 min při 1500 g na odstředivce s nastavenou teplotou 20 °C. Po vytemperování obsahu centrifugační zkumavky na laboratorní teplotu (zpravidla je dostatečná doba 10 min) se ze supernatantu pipetuje do 10ml odměrné baňky vhodný alikvot podle Tabulky 2. Odměrná baňka se doplní po značku 50% methanolem (6) a po promíchání se převede do vialky.

V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného referenčního materiálu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10638.1 – Stanovení tiamulinu metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	0

Tabulka 2. Ředění extraktů krmiv.

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

5.4 Vlastní stanovení léčiv ve vzorcích


Stanovení se provádí za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4. Parametry stanovení platí pro sestavu LC-MS/MS Waters Xevo TQD a slouží jako příklad nastavení instrumentace.

Tabulka 3. Chromatografické parametry stanovení – příklad.

Kolona	např. ACQUITY UPLC BEH C18; (50×2,1) mm × 1,7 μm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (8) a mobilní fáze B (9) podle Tabulky 4
Celková doba analýzy	6 min
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	5 μl
Retenční čas	5,02 min

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

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10638.1 – Stanovení tiamulinu metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	0

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 5. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů je uvedeno v Tabulce 6.

Tabulka 5. Parametry MS detektoru.

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	3,00 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)
Tiamulin	494,2	40	119	47
			192	28

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah tiamulinu (X) vyjádřený 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.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10638.1 – Stanovení tiamulinu metodou LC-MS/MS	Vydání	1
		Revize	0

7 Literatura

- 1 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.
- 2 J. J. Dibner, J. D. Richards: Antibiotic Growth in Agriculture: History and Mode of Action. Poultry Science Association, Inc ,2005, 84, 634-643.
- 3 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, rozšířeno 2018.
- 4 E. Patyra, C. Nebot, R. E. Gavilán, A. Cepeda, K. Kwiatek: Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of tiamulin, trimethoprim, tylosin, sulfadiazine and sulfamethazine in medicated feed, Food Additives & Contaminants: Parta A, 2018, DOI: 10.1080/19440049.2018.1426887.