

Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre

LCMSMS ile Balıklarda Avermektin Grubu ilaç Kalıntılarının Analizi



Hazırlayan
Kim. Erhan ÇAKAN
Ant Teknik Cihazlar



Bu nedenle Avrupa Birliği (AB) (37/2010 / EC) yönetmeliğine göre Avermektin grubu ilaçlar için Maksimum Kalıntı Limitleri (MRL'ler) belirlenmiştir [2].

Ülkemizde de 04/05/2012 tarihli ve 28282 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği yayınlanmıştır. Daha sonra 15.02.2016 tarih ve 29625 sayılı Resmî Gazete ile ilgili yönetmelikte değişiklik yapılmıştır [3].

Literatürlere bakıldığında, hayvansal kaynaklı gıda maddelerinde avermektin tayini için çeşitli analitik yöntemler bildirilmiştir. En yaygın kullanılan teknik Floresans dedektörlü sıvı kromatografi (LC-FLD) tekniğidir [4-6].

Floresans dedektör (FLD) kullanıldığında, bu bileşiklerin saptanması için bir türevlendirme işlemi gereklidir [7].

Genellikle kararsız türevler oluşturan karmaşık türevlendirme işleminin neden olduğu analitik sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu yüzden türevlendirme gerektirmeden daha basit numune hazırlama yöntemleri kullanılarak LCMSMS tekniği kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada ülkemizde gıda değeri olan balıklarda paraziter olarak kullanılan ve avermektin türevi olan Epiromectin (EPR), Emamectin (EMR) aktif maddelerin LCMSMS ile basit numune hazırlama tekniği kullanılarak kantitatif ve kalitatif analizi gerçekleştirilmiştir.

METOD VE MATERYALLER

Çalışmamız, Shimadzu LCMS-8040 model LCMSMS ile yapılmıştır.

KULLANILAN EKİPMAN VE KİMYASALLAR

1. LCMSMS
2. ESI iyon kaynağı
3. UHPLC
4. UHPLC kolonu
5. Otomatik pipet
6. Ultra saf su sistemi
7. Analitik terazi (0.0001 g hassasiyette)
8. Karıştırıcı
9. Santrifüj
10. Restek 25847 Q-Sep Quechers Ekstraksiyon Tuzu
11. Restek 26242 Q-Sep Quechers dSPE for Extract Cleanup
12. Asetonitril
13. Amonyum format
14. Derin Dondurucu
15. Şırınga ucu filtire
16. Standartlar

ÇALIŞMANIN AMACI

Avermektinler, Strep. avermitilis kültürlerinden elde edilmiş, büyük-halkalı lakton yapılı (16- üyeli halkalı yapı) bir grup bileşiğin genel adıdır [1].

Avermektinler, hayvanlarda iç ve dış parazitlere karşı antiparazitik amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu ilaçların yaygın kullanımı, süt, yumurta, et ve balık gibi çeşitli hayvansal kaynaklı ürünlerde ilaç kalıntılarının varlığına yol açarak insan sağlığı için bir tehdit olmaktadır.

NUMUNE VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Stok Çözelti Hazırlama

1000 ppm'lik ana stok standartları asetonitril ile hazırlanır. Ara stok olarak 100ppm ve 10ppm'e asetonitril ile seyreltilir. 5 noktalı kalibrasyon eğrisi balık matrisi kullanılarak hazırlandı. Stok çözeltileri -20°C'de saklanır.

Emamectin için kalibrasyon noktaları;

(25-50-100-150-200) ng/mL

Eprinomectin için kalibrasyon noktaları; (12,5-25-50-75-100) ng/mL

Numune Hazırlama

» 5 g balık numunesi derisiyle beraber tartılır. Restek 25847 Q-Sep Quechers Ekstraksiyon Tuzu içeren tüpe aktarılır.

» Üzerine 10 mL Asetonitril ve 10 ppm stok internal standart (IS) Moxidectin

çözeltilisinden 50 µL eklenir.

» 1 dk karıştırılır ve santrifüj edilir.

» 2 mL supernatant , Restek Q-Sep 26242 Quechers dSPE for Extract Cleanup santrifüj tüpüne eklenir.

» 1 dk vortekslenir, 2 dk santrifüj edilir.

» Supernatant filtreden süzülür

» Viallenir ve LCMSMS'e enjekte edilir.

Analitik Koşullar

Cihaz	: Shimadzu
Model	: LCMS-8040
İyon Kaynağı	: ESI, MRM Pozitif Modu
Nebulizing Gas Flow	: 2 L/dk
Heating Gas Flow	: 10 L/dk
DL Temperature	: 250 °C
Heating Block Temperature	: 400 °C
Drying Gas Flow	: 15 L/dk
UHPLC Sistemi	: Nexera (LC-30)
UHPLC Kolonu	: Raptor C18 (100mmx2.1mm, 2.7µm)
Mobil Faz A	: Su (5mM Amonyum Format)
Mobil Faz B	: Asetonitril
Akış Hızı	: 0.4 mL/dk (Gradient program)
Kolon Fırını Sıcaklığı	: 50 °C
Enjeksiyon Hacmi	: 5 µL

MRM Geçişleri

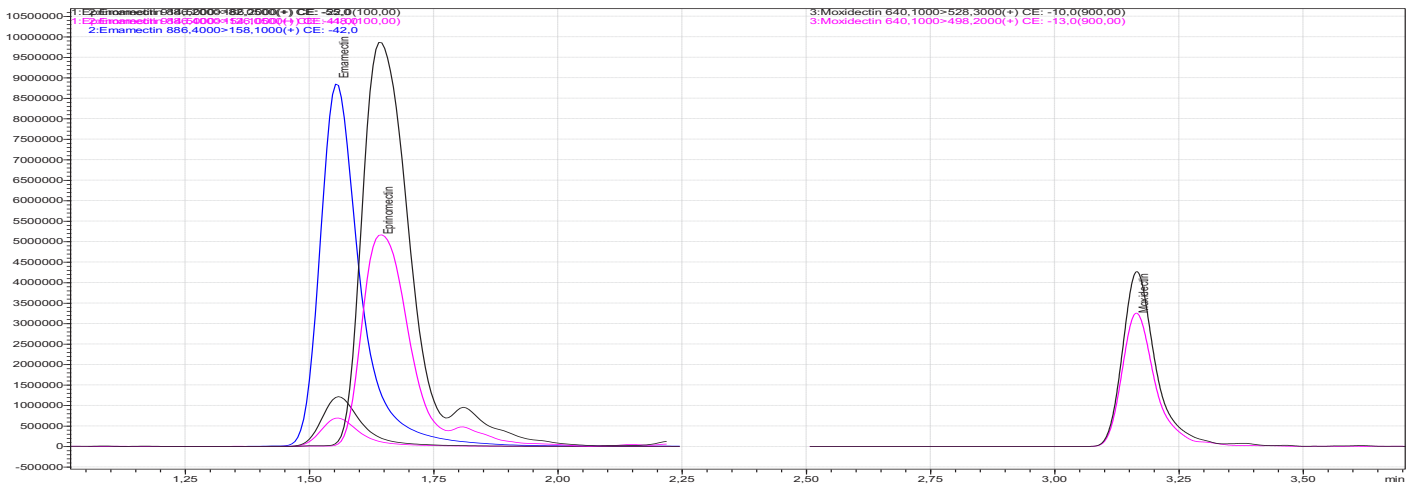
Compound	Transition
Eprinomectin	914,5>186,2
	914,5>154,1
Emamectin B1a1	886,4>158,1
	886,4>126,05
Moxidectin (IS)	640,1>528,3
	640,1>498,2



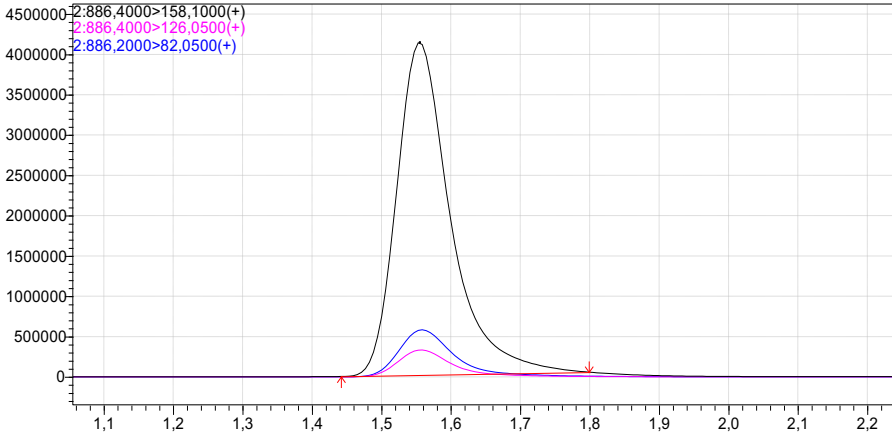
SHIMADZU
Excellence in Science

LCMS-8040

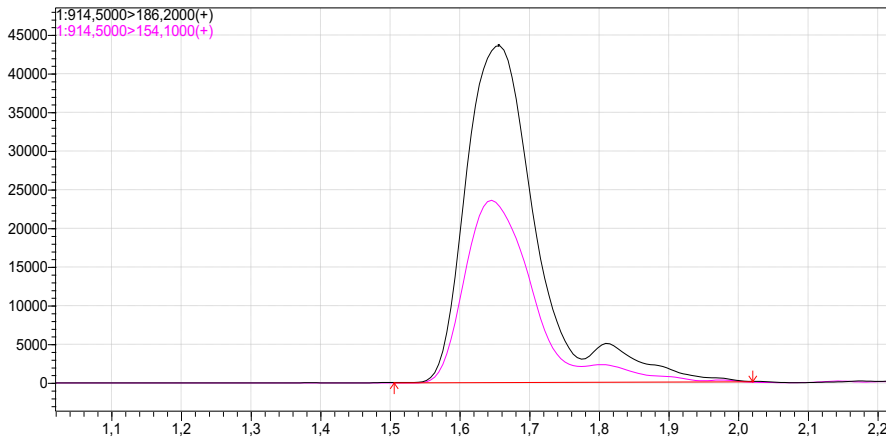
Sıvı Kromatografi Triple Quadrupole Kütle Spektrometre



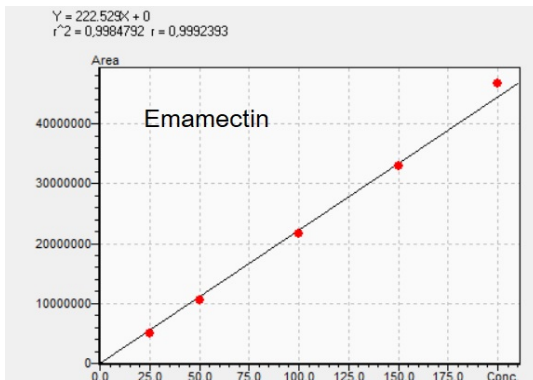
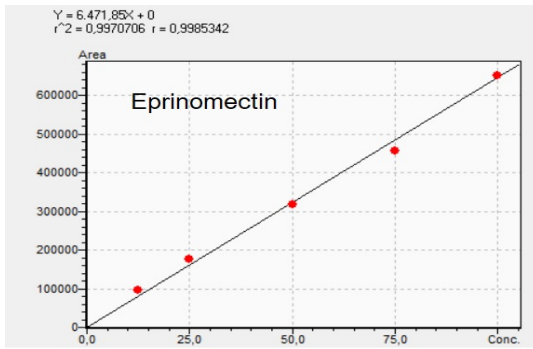
Şekil 1. Toplam İyon Kromatogramı (TIC)



Şekil 2. Balık numunesinde Emamectin 100 ng/mL spike çalışması (geri kazanım % 95.5)



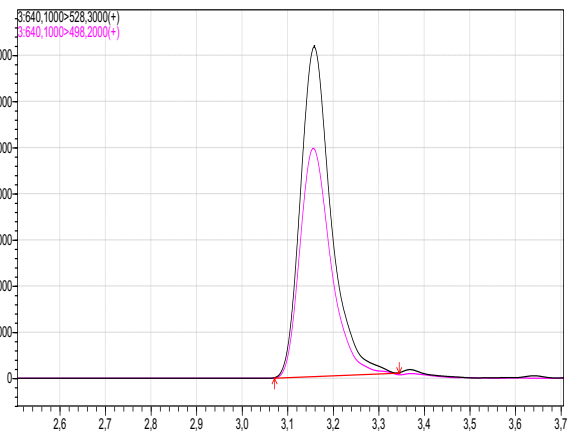
Şekil 3. Balık numunesinde Eprinomectin 50 ng/mL spike çalışması (geri kazanım % 99.8)



Şekil 4. Balık Matrisinde Emamectin ve Eprinomectin için Kalibrasyon Eğrileri

REFERANSLAR:

- [1] W.L. Shoop, H. Mroziak, M.H. Fisher, Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health, Vet. Parasitol. 59 (1995) 139–156.
- [2] Commission Regulation (EU) 37/2010, on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Off. J. Eur. Communities L 15 (2010) 1–72.
- [3] <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/02/20160215-2.htm>
- [4] L. Giannetti, A. Giorgi, F. Necci, G. Ferretti, F. Buiarelli, B. Neri, Validation study on avermectine residues in foodstuffs, Anal. Chim. Acta 700 (2011) 11–15.
- [5] X. Xia, Z. Xiao, Q. Huang, L. Xia, K. Zhu, X. Wang, J. Shen, S. Ding, Simultaneous determination of avermectin and milbemycin residues in bovine tissue by pressurized solvent extraction and LC with fluorescence detection, Chromatographia 72 (2010) 1089–1095.
- [6] D.I.S. Kolberg, M.A. Presta, C. Wickert, M.B. Adaime, R. Zanella, Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, J. Braz. Chem. Soc. 20-7 (2009) 1220–1226.
- [7] Ioulia Ch. Moschou, Marilena E. Dasenaki, Nikolaos S. Thomaidis, Ionization study and simultaneous determination of avermectins and milbemycines in fish tissue by LC-ESI-MS/MS, Journal of Chromatography B 1104 (2019) 134–140.



Şekil 5. Internal Standart 50 ng/ml

Bu Aplikasyon Notu uygulamanın gerçekleştirildiği tarihe ait bilgiler ışığında oluşturulmuştur. Bu yayında yer alan bilgilerin referans gösterilerek başka bir yerde kullanılması Ant Teknik'in iznine tabidir. Aplikasyon Notu Ant Teknik tarafından önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir.