

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 1 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

1. DESCRIPCIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO

1.1 Referencias

- Vlees, vis, honing, melk, urine, garnaal en dierlijk materiaal - het screenen, bepalen en bevestigen van tetracyclines – LC-MS/MS (Determinación y confirmación de tetraciclina en carne, pescado, miel, leche, orina, camarones y material animal por LC-MS/MS). SOAP-A-0896, versión 10. Laboratorio RIKILT, Wageningen UR, Holanda.

1.2 Introducción

El contenido de tetraciclina y sus epímeros en tejidos, se determina por LC-MS/MS. En el primer análisis de las muestras (*screening*) se utiliza como estándar interno metaciclina, mientras que para el análisis confirmatorio de muestras detectadas se utiliza un deuterado de oxitetraciclina. La muestra previamente homogenizada se extrae con un buffer EDTA-Mcllvain. Se agita y centrifuga para separar las fases, se verifica pH y a continuación se pasa por una columna SPE Oasis HLB. Luego, el eluido se lleva a sequedad bajo flujo de nitrógeno a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ y finalmente se reconstituye con fase móvil para ser inyectado en un equipo LC-MS/MS.

El método ha sido validado para determinar y cuantificar en forma directa el contenido de tetraciclina, mientras que el contenido de sus epímeros se cuantifica en forma indirecta.

El método ha sido aplicado para la determinación del contenido total de tetraciclina en músculo de salmón.

1.3 Equipamiento

- a) Homogenizador (moulinex o similar)
- b) Vórtex (Heidolph Multireax)
- c) Refrigerador
- d) Congelador
- e) Micropipetas
- f) Centrifuga
- g) Cromatógrafo líquido compuesto por:
 - UPLC IClass – MS/MS XEVO TQS
 - Columna analítica Acquity UPLC HSS T3 de 1,8 μm 2,1 mm x 100 mm Waters
- h) Equipo para obtener agua: Millipore Synergy
- i) Tubos eppendorf de 1 mL
- j) Tubos de centrifuga de 50 mL
- k) Filtros de lana de vidrio: Whatman 1820-150
- l) pHmetro
- m) Cintas indicadoras de pH
- n) Sonicador
- o) Sistema de secado de gas nitrógeno
- p) Jeringa de 10 mL
- q) Balanzas analíticas

| | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| Elaborado | Revisado | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector |
| | | Director |

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 2 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

- r) Balanzas pesaje de muestras
- s) Cartuchos de extracción SPE Oasis HLB 6 mL
- t) Dispensador 10 mL

1.4 Reactivos y soluciones

- a) Metanol grado HPLC
- b) Agua grado HPLC
- c) Na₂EDTA grado PA
- d) Na₂HPO₄ grado PA
- e) Ácido fórmico grado PA
- f) Ácido cítrico monohidratado grado PA
- g) Formiato de amonio grado PA

Soluciones:

1. Solución Tampón EDTA/McIllyaine 0,1 M; pH 4,0

- Mezclar 500 mL de la solución de ácido cítrico 0,1 M con 280 mL de tampón de fosfato 0,2 M en un matraz volumétrico de 2 litros y añadir 74,4 gramos de Na₂EDTA. Agregue 1 litro de agua milliQ y revuelva. Agite hasta que el EDTA se disuelva.

- Controle el pH y ajuste el pH a 4,0 con solución de ácido cítrico o con tampón de fosfato 0,2 M. Llene hasta la marca y mezcle.

- Esta solución se puede mantener durante 1 mes a temperatura ambiente. Antes del uso, controle el pH y, si es necesario, ajústelo a pH 4,0 con solución de ácido cítrico o con tampón de fosfato 0,2 M.

2. Ácido cítrico 0,1 M

- Agregar 21 gramos de ácido cítrico monohidratado a un matraz de 1 litro y enrasar con agua milliQ.

3. Buffer fosfato 0,2 M

- Agregar 35,6 gramos de Na₂HPO₄ a un matraz de 1 litro y enrasar con agua milliQ.

Fase Móvil:

Fase móvil A: formiato de amonio 0,2 mM + Ac. fórmico 0,16% en agua.

- En un matraz de 1 litro, agregar aproximadamente 500 mL de agua HPLC, 0,13 gr de formiato de amonio y 1,6 mL de ácido fórmico. Mezclar y enrasar a un litro con agua HPLC.

| | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| Elaborado | Revisado | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector |
| | | Director |

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 3 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

Fase móvil B: formiato de amonio 0,2 mM + Ac. fórmico 0,16% en metanol.

- En un matraz de 1 litro, agregar aproximadamente 500 mL de metanol HPLC, 0,13 gr de formiato de amonio y 1,6 mL de ácido fórmico. Mezclar y enrazar a un litro con metanol.

1.5 Estándares

1.5.1 Procedencia

- 4-Epi-Tetraciclina HCl (epi-TC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- 4-Epi-Oxitetraciclina (epi-OTC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- 4-Epi-Clortetraciclina (epi-CTC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- Oxitetraciclina HCl (OTC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- Clortetraciclina HCl (CTC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- Tetraciclina (TC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- Doxiciclina (DXC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado
- Metaciclina (MTC), Dr. Ehrenstorfer o similar. Pureza según certificado (E.I. Screening)
- Oxitetraciclina-13C22-15N2 (OTC-13C), Buchem o similar. Pureza según certificado (E.I. Confirmación).

1.5.2 Forma de preparación

- De solución madre (solución stock), intermedia y solución para fortificación, seguir las instrucciones del IT LF N°150.

1.6 Procedimiento de extracción

- 1) Pesar $2 \pm 0,1$ gr de muestra en un tubo falcon de 50 mL
- 2) Las muestras fortificadas se deben homogenizar con vórtex y dejar reposar durante 15 minutos para permitir que las soluciones de fortificación se mezclen con la matriz
- 3) Agregar 25 mL del buffer de extracción (EDTA-McIlvain 0,1 M; pH 4,0). Agitar manualmente, prestando especial atención a la disgregación del músculo para asegurar el contacto con el buffer de extracción
- 4) Mezclar con un agitador de tubos durante 15 minutos
- 5) Centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm
- 6) Filtrar el extracto sobre un filtro de fibra de vidrio (Whatman 1820-150), a un segundo tubo falcon de 50 mL
- 7) Agregar 20 mL de buffer de extracción al residuo del primer tubo. Agitar manualmente, prestando especial atención a la disgregación del músculo para asegurar el contacto con el buffer de extracción
- 8) Mezclar con un agitador de tubos durante 15 minutos
- 9) Centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm
- 10) Filtrar el extracto sobre un filtro de fibra de vidrio (Whatman 1820-150), al segundo tubo falcon de 50 ml, mezclando con el primer extracto

| | | | |
|-----------------|--------------|-------------|----------|
| Elaborado | Revisado | | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector | Director |

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 4 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

- 11) Enjuagar el filtro de fibra de vidrio con 5 ml de buffer de extracción y combinar con los extractos
- 12) Medir el pH del extracto y ajustar a pH 4,0 con solución de ácido cítrico o buffer fosfato
- 13) Acondiciona una columna HLB de 6 cc con 4 ml de metanol, 4 ml de agua milliQ y 4 ml de buffer de extracción
- 14) Pasar 30 mL del extracto por la columna
- 15) Enjuagar la columna con 2 mL de buffer de extracción y dos veces con 2 mL de agua milliQ
- 16) Secar la columna durante 15 minutos
- 17) Poner un tubo de vidrio bajo la columna
- 18) Agregar 10 mL de metanol a la columna
- 19) Eluir gota a gota con metanol. Usar vacío suave si es necesario
- 20) Evaporar el extracto a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ bajo flujo de nitrógeno
- 21) Agregar 300 uL de solución de fase móvil (85% FMA – 15% FMB) y agitar 5 minutos en vórtex
- 22) Sonicar por 5 minutos
- 23) Trasferir a un vial HPLC

1.7 Análisis instrumental

1.7.1. Condiciones cromatográficas

- Flujo: 0,4 mL/min
- Temperatura horno columna: $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- Volumen Inyección: 10 μl
- Columna analítica Acquity UPLC HSS T3 de 1,8 μm 2,1 mm x 100 mm Waters
- Gradiente:

| Tiempo | A% | B% |
|--------|----|----|
| 0 | 98 | 2 |
| 1,0 | 98 | 2 |
| 2,0 | 55 | 45 |
| 3,1 | 25 | 75 |
| 3,3 | 98 | 2 |
| 5,5 | 98 | 2 |

| | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| Elaborado | Revisado | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector |
| | Director | |

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 5 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

1.7.2. Condiciones espectrómetro de masas

- **Modo positivo**

| Analito | Q1 Prnt (da) | Q3 dau (Da) | DWELL (s) | CONE (V) | COLL (Ev) |
|---------|-----------------|----------------|-----------|----------|-----------|
| TC | 445,19 | 410,25 | 0,002 | 30 | 17 |
| | 445,19 | 154,12 | 0,002 | 30 | 25 |
| OTC | 461,22 | 426,20 | 0,002 | 30 | 17 |
| | 461,22 | 337,19 | 0,002 | 30 | 25 |
| CTC | 479,16 | 154,15 | 0,002 | 30 | 28 |
| | 479,16 | 444,17 | 0,002 | 30 | 25 |
| DXC | 445,18 | 428,18 | 0,002 | 30 | 22 |
| | 445,18 | 154,12 | 0,002 | 30 | 15 |
| EPI-TC | 445,19 | 410,25 | 0,002 | 30 | 17 |
| | 445,19 | 154,12 | 0,002 | 30 | 25 |
| EPI-OTC | 461,19 | 426,30 | 0,002 | 30 | 17 |
| | 461,19 | 337,16 | 0,002 | 30 | 17 |
| EPI-CTC | 479,16 | 154,15 | 0,002 | 30 | 25 |
| | 479,16 | 444,17 | 0,002 | 30 | 25 |
| MTC | 443,17 | 426,24 | 0,002 | 20 | 15 |
| OTC-C13 | 485,23 | 356,22 | 0,002 | 30 | 15 |

- **Parámetros Fuente de Ionización (ES+)**

| Parámetros fuente | |
|----------------------|----------|
| Capillary | 3 kV |
| Cone | 20 V |
| Source temp | 150°C |
| Desolvation temp | 500°C |
| Cone gas flow | 9 L/hr |
| Desolvation gas flow | 900 L/hr |
| Collision gas flow | on |

| | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| Elaborado | Revisado | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector |
| | | Director |

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 6 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

- **Tiempos retención**

| Analito | Tiempo de Retención (min) |
|----------------------|----------------------------------|
| Tetracilina | 2,44 ± 30 seg |
| Oxitetraciclina | 2,48 ± 30 seg |
| Clortetraciclina | 2,90 ± 30 seg |
| Doxiciclina | 3,02 ± 30 seg |
| Epi-Tetraciclina | 2,28 ± 30 seg |
| Epi-Oxitetraciclina | 2,36 ± 30 seg |
| Epi-Clortetraciclina | 2,68 ± 30 seg |
| Metaciclina | 2,92 ± 30 seg |
| OTC-13C | 2,49 ± 30 seg |

2. Cuantificación

- La detección mediante MS/MS se realiza utilizando 2 iones de transición para cada analito. El ion de transición con la mayor intensidad es utilizado para la cuantificación, mientras que el ion de menor intensidad es utilizado con fines de confirmación.

- Las curvas para la cuantificación son construidas a partir de matriz fortificada con estándares certificados. Se realizarán curvas en cada set de muestras que incluya muestras sospechosas.

- La cuantificación de los epímeros se realiza en forma indirecta, utilizando las curvas de la droga en su forma no epimerizada. La curva de calibración realizada para OTC es utilizada para la cuantificación indirecta de epi-OTC, la curva de calibración realizada para TC es utilizada para la cuantificación indirecta de epi-TC, la curva realizada para CTC es utilizada para la cuantificación indirecta de epi-CTC.

2.1. Resultados

Los resultados serán expresados en ng/g (ppb).

3. Criterios de confirmación para muestras positivas y controles de calidad interno

Los criterios de confirmación para un analito detectado por LC MS/MS son los siguientes:

- Tiempo de Retención del analito: El tiempo de retención del analito detectado en una muestra no debe superar en un $\pm 2,5\%$ del tiempo de retención del control.

| | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| Elaborado | Revisado | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector |
| | | Director |

| | | | |
|--|---|--|--------------------|
| Instructivos IT LF N°232 Lab. de Farmacología | MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TETRACICLINAS POR LC-MS/MS | Revisión N°: 1 Fecha: Marzo 2018 | Páginas: 7 de 7 |
|--|---|--|--------------------|

- b) Tiempo de Retención Relativo: El cociente entre el tiempo de retención del analito y el tiempo de retención del estándar interno, no debe superar un $\pm 2,5\%$ entre una muestra positiva y el control.
- c) Ratio: Primero se calcula el cociente entre la transición minoritaria y la transición mayoritaria, expresada en A veces.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Área transición minoritaria}}{\text{Área transición mayoritaria}}$$

Una vez obtenido el ratio, este se multiplica por 100 para ser expresado como Intensidad Relativa:

$$\text{Intensidad Relativa} = \text{Ratio} \times 100\%$$

Obtenida la Intensidad relativa, tanto para las muestras detectadas como para los controles, la Intensidad relativa del control se compara con la siguiente tabla de Intensidades relativas:

| Intensidad relativa (% del pico de base) | Tolerancia máxima permitida |
|---|------------------------------------|
| >50% | +/-20% |
| >20%-50% | +/-25% |
| >10%-20% | +/-30% |
| ≤10% | +/-50% |

A cada intensidad relativa le corresponde una tolerancia. Tal tolerancia se aplica entonces al ratio del control, quedando:

$$\text{Ratio control} \pm \text{Tolerancia}$$

Luego, se compara si el ratio obtenido para una muestra positiva cae dentro del intervalo de ratio de los controles. Cabe destacar que el ratio es siempre menor o igual a 1.

- d) Señal Ruido: Debe ser igual o mayor a 3 en la transición minoritaria de una muestra considerada positiva.

Finalmente, una muestra es considerada positiva si cumple con los 4 criterios de confirmación en forma simultánea. El Jefe Técnico o Director Técnico deberán verificar estos criterios antes de informar una muestra positiva.

| | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| Elaborado | Revisado | Aprobado |
| Jefe de Calidad | Jefe Técnico | Subdirector |
| | Director | |