6.17. STANOVENIE PENICILÍNOV A CEFALOSPORÍNOV METÓDOU UPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami a po rozdelení rezíduí sa tieto detegujú hmotnostným detektorom pracujúcim v režime MS/MS v pozitívnom móde. Ionizácia ESI Identifikácia látky je prevedená dvoma tranzíciami (2 transitions) a kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio). Kvantifikácia je prevedená metódou vnútorného štandardu. Vnútorným štandardom je cefalotín.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na konfirmačné stanovenie penicilínov a cefalosporínov v svale, mlieku, vajciach, obličke a pečeni.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Ampicillin anhydrous (AP)
3.1.2 Amoxicillin (AX)
3.1.3 Cloxacillin sodium salt monohydrate (CX)
3.1.4 Dicloxacillin sodium salt monohydrate (DCX)
3.1.5 Oxacillin sodium salt monohydrate (OX)
3.1.6 Penicillin G sodium salt (PG)
3.1.7 Cefapirin sodium (CP)
3.1.8 Cephalexin hydrate (CL)
3.1.9 Cephalothin sodium salt (CT)
3.1.10 Cefazolin sodium salt (CZ)
3.1.11 Cefoperazone sodium salt (CF)
3.1.12 Nafcillin sodium salt monohydrate (NF)
3.1.13 Cefquinome sulfate (CQ)
3.1.14 Ceftiofur (CR)
3.1.15 Cefalonium hydrate (CM)
3.1.16 acetonitril gradient grade
3.1.17 metanol gradient grade
3.1.18 kyselina mravčia
3.1.19 octan amónny
3.1.20 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile
3.2.2 0,1 % kyselina mravčia
3.2.3 0,2 M octan amónny

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu ampicilínu (100 mg/l vo vode) – (AP)
Navážiť 10,2 mg ampicilínu (3.1.1.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.2 Zásobný roztok štandardu amoxicilínu (100 mg/l vo vode) – (AX)
Navážiť 10,3 mg amoxicilínu (3.1.2.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.3 Zásobný roztok štandardu cloxacilínu (100 mg/l vo vode) – (CX)
Navážiť 10,5 mg monohydrátu sodnej soli cloxacilínu (3.1.3.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu dicloxacilínu (100 mg/l vo vode) – (DCX)
Navážiť 10,9 mg monohydrátu sodnej soli dicloxacilínu (3.1.4.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť vo vode a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu oxacilínu (100 mg/l vo vode) – (OX)
Navážiť 12,5 mg monohydrátu sodnej soli oxacilínu (3.1.5.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu penicilínu G (100 mg/l vo vode) – (PG)
Navážiť 10,7 mg sodnej soli penicilínu G (3.1.6.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.7 Zásobný roztok štandardu cefapirínu (100 mg/l vo vode) – (CP)
Navážiť 10,7 mg cefapirínu sodného (3.1.7.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.8 Zásobný roztok štandardu cephalexínu (100 mg/l vo vode) – (CL)
Navážiť 10,0 mg cephalexín hydrátu (3.1.8.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.9 Zásobný roztok štandardu cefalotínu (100 mg/l vo vode) – (CT)
Navážiť 10,6 mg sodnej soli cefalotínu (3.1.9.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.10 Zásobný roztok štandardu cefazolínu (100 mg/l vo vode) – (CZ)
Navážiť 10,6 mg sodnej soli cefazolínu (3.1.10.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.11 Zásobný roztok štandardu cefoperazonu (100 mg/l vo vode) – (CF)
Navážiť 10,6 mg sodnej soli cefaperazonu (3.1.11.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.12 Zásobný roztok štandardu nafcilínu (100 mg/l vo vode) – (NF)
Navážiť 11,6 mg monohydrátu sodnej soli nafcilínu (3.1.12.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.13 Zásobný roztok štandardu cefquinomu (100 mg/l vo vode) – (CQ)
Navážiť 12,1 mg cefquinomu (3.1.13.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.14 Zásobný roztok štandardu ceftiofuru (100 mg/l vo vode) – (CR)
Navážiť 10,2 mg ceftiofur (3.1.14.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.15 Zásobný roztok štandardu cefalonia (100 mg/l vo vode) – (CM)
Navážiť 10,5 mg hudrátu cefalonia (3.1.15.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.

Poznámka: Doba použiteľnosti zásobných štandardných roztokov je 1 mesiac od pripravenia. Zásobné štandardné roztoky uchovávať v tme pri teplote 4 – 8 ^{o}C.

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný roztok štandardu cefalotínu CT **PIS** (1 mg/l vo vode)
Zobrať 1 ml zo zásobného roztoku štandardu CT (100 mg/l) (3.3.1.9.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.2 Základný roztok štandardov penicilínov a cefalosporínov (CL, CZ, CP, CF, PG, OX, NF, DCX, CX, AP, AX, CT, CQ,CR,CM) **PFC** (1 mg/l vo vode)
Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov (100 mg/l) (3.3.1.1.) – (3.3.1.8.) a (3.3.1.10.) - (3.3.1.15). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

Na fortifikáciu mlieka

3.3.2.3 Základný zmesný roztok štandardov (PG, AX, AP, OX, CX, DCX, NF, CP, CL,CF, CZ) **PFCM** (PG, AX, AP 0,2 mg/l, OX, CX, DCX, NF 1,5 mg/l, CP 3 mg/l, CL,CR 5 mg/l, CF, CZ, 2,5 mg/l, CM, CQ 1 mg/l vo vode)
Zobrať 0,2 ml zo zásobných roztokov štandardov (PG, AX, AP) (3.3.1.6.), (3.3.1.2.), (3.3.1.1.), 1,5 ml (OX, CX, DCX, NF) (3.3.1.3.) – (3.3.1.5.), (3.3.1.12.), 3 ml (CP) (3.3.1.7.), 5 ml (CL,CR) (3.3.1.8.), (3.3.1.14.), 2,5 ml (CF, CZ, CQ) (3.3.1.11.), (3.3.1.10.), (3.3.1.13), 1 ml CM (3.3.1.15.) (100 mg/l). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.4 Základný roztok štandardu cephalothinu CT **PIS2** (10 mg/l vo vode)
Zobrať 10 ml zo zásobného roztoku štandardu CT (100 mg/l) (3.3.1.9.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

Na fortifikáciu svalu, pečene, obličky a vajca
3.3.2.5 Základný zmesný roztok štandardov (CF, CZ, OX, CX, DCX, NF) **PFCS1** (10 mg/l)
Zobrať 10 ml zo zásobných roztokov štandardov (100 mg/l) (3.3.1.3.) – (3.3.1.5.), (3.3.1.10.) – (3.3.1.12.) . Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.6 Základný zmesný roztok štandardov (PG, AX, AP, CP, CM,CQ) **PFCS2** (1mg/l)
Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov (100 mg/l) (3.3.1.1.), (3.3.1.2.), (3.3.1.6.), (3.3.1.7.), (3.3.1.13.), (3.3.1.15.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.7 Základný zmesný roztok štandardov CL, CR **PFCS3** (2mg/l)
Zobrať 2 ml zo zásobných roztokov štandardov CL, CR (100 mg/l) (3.3.1.8.), (3.3.1.14.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.8 Základný zmesný roztok štandardu CL **PFCS4** (10 mg/l)
Zobrať 10 ml zo zásobného roztoku štandardu CL (100 mg/l) (3.3.1.8.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.9 Základný zmesný roztok štandardov CP, CR **PFCS5** (2mg/l)
Zobrať 2 ml zo zásobných roztokov štandardov CP, CR (100 mg/l) (3.3.1.7.), (3.3.1.14). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.10 Základný zmesný roztok štandardov (PG, AX, AP, CM, CQ) **PFCS6** (1mg/l)
Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov (100 mg/l) (3.3.1.1.), (3.3.1.2.), (3.3.1.6.), (3.3.1.13.), (3.3.1.15.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmes štandardov penicilínov a cefalosporínov – **PMC1** (CL, CZ, CP, CF, PG, OX, NF, DCX, CX, AP, AX, CT, CR,CM,CQ) (10 µl/l vo vode)
Zobrať 1 ml zo základného roztoku štandardov (1 mg/l) (3.3.2.2.), (3.3.2.1.). Preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.2 chromatografická kolóna : UPLC C18
4.3 analytická váha HELAGO HM 200
4.4 trepačka head over head HEIDOLPH Reax 2
4.5 centrifúga BIOFUGE STRATOS
4.6 minishaker Vortex
4.7 termovap Ecom
4.8 teflónové centrifugačné nádobky – 50 ml
4.9 laboratórne odmerné sklo:100 ml odmerné banky, 1 ml pipety
4.10 striekačkový mikrofilter
4.11 SPE kolónky

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorka sa dobre zhomogenizuje.

5.2 Príprava kvality kontrol vzoriek - matricová kalibrácia

5.2.1 Príprava negatívnej vzorky a fortifikovaných vzoriek

Na prípravu vzoriek sa použijú negatívne matrice. Vzorky sa fortifikujú v 0.5, 1, 2 a 5 násobku ustanoveného MRL .
mlieko:
Navážiť 2 g vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 2. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2
Sval, pečeň, vajce:
Navážiť 2 g vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 1. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2
oblička:

Navážiť 2 g vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať jednotlivé roztoky štandardov podľa tabuľky 3. Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek svalu, pečene a vajca

Koncentrácia penicilínov a cefalosporínov vo vzorke (µg/kg)			Koncentrácia vn.štandardu cephalothinu vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku PFCS1 (µl)	Prídavok roztoku PFCS2 (µl)	Prídavok roztoku PFCS3 (µl)	Prídavok roztoku PIS (µl)
CF, CZ, OX, CX, DCX, NF	PG, AX, AP, CP, CQ, CM	CL, CR	CT	CF, CZ, OX, CX, DCX, NF	PG, AX, AP, CP, CQ, CM	CL, CR	CT
0	0	0	100	0	0	0	200
150	25	100	100	30	50	100	200
300	50	200	100	60	100	200	200
600	100	400	100	120	200	400	200
1500	250	1000	100	300	500	1000	200

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek mlieka

koncentrácia penicilínov a cefalosporínov vo vzorke(µg/kg)						konc. vn. štandardu vo vzorke(µg/kg)	Prídavok roztoku PFCM (µl)	Prídavok roztoku PIS2 (µl)
PG, AP, AX	OX,CX, DCX,NF	CF, CZ	CP	CL, CR	CM, CQ	CT	PG,AP, AX,OX,CX, DCX,NF,CF, CZ,CP,CL, CQ,CM,CR	CT
0	0	0	0	0	0	100	0	20
2	15	25	30	50	10	100	20	20
4	30	50	60	100	20	100	40	20
8	60	100	120	200	40	100	80	20
20	150	250	300	500	100	100	200	20

Tabuľka 3 Príprava fortifikovaných vzoriek obličky

Koncentrácia penicilínov a cefalosporínov vo vzorke (µg/kg)				Koncentrácia vn.štandardu cephalothinu vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku PFCS1 (µl)	Prídavok roztoku PFCS6 (µl)	Prídavok roztoku PFCS4 (µl)	Prídavok roztoku PFCS5 (µl)	Prídavok roztoku PIS (µl)
CF, CZ, OX, CX, DCX, NF	PG, AX, AP, CM, CQ	CL	CP, CR	CT	CF, CZ, OX, CX, DCX, NF	PG, AX, AP,CM, CQ	CL	CP,CR	CT
0	0	0	0	100	0	0	0	0	200
150	25	500	50	100	30	50	100	50	200
300	50	1000	100	100	60	100	200	100	200
600	100	2000	200	100	120	200	400	200	200
1500	250	5000	500	100	300	500	1000	500	200

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Fortifikácia vzorky vnútorným štandardom (úroveň 0,1 mg/kg cefalotínu)

mlieko, sval, pečeň, oblička, vajce:
Navážiť 2 g homogenizovanej vzorky do centrifugačnej teflónovej nádobky. Pridať 200 µl roztoku PIS (3.3.2.1.). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť 10 min. a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2

5.3.2 Extrakcia

mlieko, sval, pečeň, oblička:
Pridať 8 ml acetonitrilu (3.1.16). Umiestniť na trepačku head over head na 10 minút pri otáčkach 100 ot./min. Centrifugovať 5 min. pri 14 000 g. Odobrať supernatant. Odfúkať dosucha pod prúdom dusíka (teplota 50 ^{o}C, ~1 hod.). Reziduá rozpustiť v 0,3 ml 0,2 M octanu amónneho (3.2.3). Prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

vajce:
Pridať 10 ml zmesi acetonitril (3.1.16) / voda (3.1.20) (8:2).Premiešať na Vortexe 1 min. Umiestniť na trepačku head over head na 10 minút pri otáčkach 100 ot./min. Centrifugovať 5 min. pri 23 000 g. Supernatant zliať a prečistiť na SPE kolónke. Eluát z SPE kolónky centrifugovať 5min pri 23000g. Výsledný supernatant odfúkať pod prúdom dusíka (teplota 50 ^{o}C) na objem menší ako 1ml. Doplniť na objem 1ml deionizovanou vodou (3.1.20). Prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter – teflón 0,45um.. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

Poznámka: V prípade, že sa vzorka koncentračne vymyká z rozsahu meranej kalibračnej krivky je pri opakovanom meraní upravená tak, aby koncentračne spadala do kalibračného rozsahu.

5.4 Chromatografická analýza

UPLC-podmienky:
chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 ^{0}C
prietok: 0,3 ml/min.
eluent: 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile / 0,1 % kyselina mravčia
gradientová elúcia
nástrek: 10µl

MS podmienky:
ionizácia:ESI pozitívna

Voltages:
Capillary (kV) : 2,50
Extractor (V): 5
RF Lens (V): 0

Temperatures:
Source Temp (^{0}C): 120
Desolvation Temp (^{0}C): 400

Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 600
Cone (l/hr): 60

Analyser:
LM Resolution 1: 13,5
HM Resolution 1: 13,5
Ion Energy 1: 1
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 13,5
HM Resolution 2: 13,5
Ion Energy 2: 0,5

Tabuľka 4 Parametre nastavenia MS/MS detekcie

Name	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
amoxicilín	1,29	365,8	**113,8** 207,9	19	19 13
cefapirín	1,46	423,8	**291,9** 151,8	24	15 25
cefquinome	1,60	528,9	**133,9** 395,8	25	15 15
ampicilín	1,81	349,9	**105,9** 159,8	25	19 15
cefalexín	1,84	347,9	**157,8** 105,9	21	9 27
cefalonium	1,90	458,8	**151,8** 336,9	19	19 10
cefazolín	2,19	454,8	155,8 **322,9**	19	17 13
penicillín G	3,4	334,9	175,9 **159,8**	32	23 24
cefaperazon	2,53	645,8	**529,9** 289,9	21	12 21
ceftiofur	2,93	523,8	125,9 **240,9**	34	30 19
cefalotín **IS**	3,19	336,8	**151,8**	19	16
oxacilín	3,92	401,9	**159,8** 242,9	19	14 13
cloxacilín	4,17	435,8	**159,8** 276,9	19	14 15
nafcilín	4,34	414,9	**198,9** 170,8	21	19 34
dicloxacilín	4,70	469,8	**159,8** 310,8	20	14 15

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok PMC1. Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

Koncentrácia zložky je vyhodnotená pomocou matricovej kalibračnej krivky s korekciou na vnútorný štandard. Do kalibračnej závislosti sa vynáša na
os x: pomer koncentrácie zložky/ koncentrácie vnútorného štandardu
os y: pomer plochy zložky/plochy vnútorného štandardu

<u>Kvantifikácia – metóda vnútorného štandardu.</u>

C koncentrácia vzorky (µg/kg)

$$C = c_1 \cdot \frac{sample\,area \cdot SI\,Sd\;c_1\;area}{SI\,sample\,area \cdot Sd\;c_1\;area}$$

Kvantifikácia robená na dominantné produkované ióny, ktoré sú v tabuľkách 4 a 5 zvýraznené v stĺpci Product. V prípade pozitívnej vzorky je nutná kontrola iónových pomerov kvantifikačnej a kvalifikačnej tranzície. Iónový pomer musí spĺňať podmienky definované v Nariadení ES 657/2002.

7 LITERATÚRA

1. B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, Liquid-chromatography/tandem mass-spectrometry, Screening method for identification residues of antibiotics in meat, AFSSA- Agence Francaise de Securité Sanitaire des Aliments BP 90203-35302 Fougéres cedex, France
2. Y.Zhou, D.Lavorato, T.Mathews, S.Countryman, Rapid LC/LC/MS Analysis of Antibiotics in Meat for Human Consumption Using Kinetex 2,6um Core-Shell LC Column, Aplikačný list Phenomenex

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC – ultraúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
MRL – maximálny reziduálny limit
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
MRM – multiple reaction monitoring
e.g. - napríklad