CH 6.18. STANOVENIE AMINOGLYKOZIDOV METÓDOU HPLC/MS/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Na analýzu aminoglykozidov sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami, na analýzu streptomycínu a dihydrostreptomycínu v mede sa použije HILIC chromatografická kolóna. 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 externej kalibrácie.
.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je vhodná na konfirmačné stanovenie aminoglykozidov v mäse, mlieku a mede.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Streptomycin sulfate (STM)
3.1.2 Apramycin sulfate (AM)
3.1.3 Neomycin trisulfate hydrate (NM)
3.1.4 Dihydrostreptomycin sesquisulfate (DSTM)
3.1.5 Gentamycin sulfate (GM)
3.1.6 Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate (SM)
3.1.7 Paromomycin sulfate (PM)
3.1.8 Acetonitril gradient grade
3.1.9 Kyselina octová p.a.
3.1.10 Kyselina trichlóroctová p.a
3.1.11 Dodekahydrát fosforečnan trisodný p.a.
3.1.12 Kyselina ortofosforečná
3.1.13 Heptane-sulfonic acid sodium salt
3.1.14 Metanol gradient grade
3.1.15 Pentafluoropropiónová kyselina
3.1.16 Kyselina mravčia
3.1.17 Heptafluorobutyric acid (HFBA)
3.1.18 deionizovaná voda
3.1.19 Dihydrogénfosforečňan draselný KH_2PO_4 p.a.
3.1.20 Kyselina chlórovodíková 37% p.a.
3.1.21 Na_2EDTA . $2H_2O$ p.a.
3.1.22 Hydroxid sodný p.a.
3.1.23 Mravčan amónny p.a.

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 Extrakčný pufer
Navážiť 2 g heptane-sulfonic acid sodium salt (3.1.13.) a 1,9 g Na_3PO_4 x 12 H_2O (3.1.11.). Doplniť do 200 ml deionizovanou vodou. Upraviť pH na 2 pomocou kyseliny ortofosforečnej (3.1.12.).
3.2.2 10 % kyselina octová
3.2.3 5% kyselina trichlóroctová
3.2.4 0,1% pentafluoropropiónová kyselina
3.2.5 0,1% kyselina mravčia
3.2.6 0,1% kyseliny mravčia v acetonitrile
3.2.7 100 $mmol.dm^{-3}$ HFBA
3.2.8 5 $mmol.dm^{-3}$ HFBA
Zobrať 10 ml 100 $mmol.dm^{-3}$ HFBA (3.2.7.) a doplniť do 200 ml deionizovanou vodou.
3.2.9 Fosfátový pufer
Navážiť 1,36 g dihydrogénfosforečňanu draselného (3.1.19), rozpustiť v 1 l deionizovanej vody, pH upraviť s 1M kyselinou chlorovodíkovou (3.2.10) na hodnotu 4,0. Pridať 0,15g Na_2EDTA . $2H_2O$ (3.1.21) a 20 g trichlóroctovej kyseliny (3.1.10)
3.2.10 1M kyselina chlorovodíková
3.2.11 30% hydroxid sodný
3.2.12 3% kyselina mravčia v metanole
3.2.13 0,1% kyselina mravčia vo vode: 0,1% kyseliny mravčia v acetonitrile (30:70)
3.2.14 metanol – voda (1:1)
3.2.15 250 mM mravčan amónny v zmesi metanol – voda (1:1)

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Zásobné roztoky štandardov

3.3.1.1 Zásobný roztok štandardu streptomycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 12,5 mg streptomycin sulfate (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 apramycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 12,1 mg apramycin sulfate (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 dihydrostreptomycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 12,8 mg dihydrostreptomycin sesquisulfate (3.1.4.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.4 Zásobný roztok štandardu gentamycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 15,3 mg gentamycin sulfate (3.1.5.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.5 Zásobný roztok štandardu neomycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 14,3 mg neomycin trisulfate salt hydrate (3.1.3.) do 100 ml odmernej banky. Rozpustiť v malom množstve vody a doplniť po značku deionizovanou vodou.
3.3.1.6 Zásobný roztok štandardu spectinomycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 14,9 mg spectinomycin dihydrochloride pentahydrate (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 paromomycínu (100 mg/l vo vode)
Navážiť 13,6 mg paromomycin sulfate (3.1.7.) 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 pripravovať do plastových odmerných baniek a uchovávať v tme pri teplote 4 – 8 ^{o}C.

3.3.2 Základné roztoky štandardov

3.3.2.1 Základný zmesný roztok štandardov NM, PM, STM, DSTM,GM, AM, SM **AFC1** (NM, PM, STM, DSTM 10 mg/l, GM 1 mg/l, AM 20 mg/l, SM 6 mg/l vo vode)

Zobrať zo zásobných roztokov štandardov: 10 ml NM, PM, STM, DSTM (100 mg/l) (3.3.1.5.), (3.3.1.7.), (3.3.1.1.), (3.3.1.3.), 1 ml GM (3.3.1.4.), 20 ml AM (3.3.1.2.) a 6 ml SM (3.3.1.6.) preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.2 Základný zmesný roztok štandardov SM, STM, DSTM, GM, NM, AM, PM **AFC2** (SM, STM, DSTM 4 mg/l, GM 2 mg/l, NM 30 mg/l, AM 20 mg/l, PM 10 mg/l vo vode)

Zobrať zo zásobných roztokov štandardov: 4 ml SM, STM, DSTM (100 mg/l) (3.3.1.6.), (3.3.1.1.), (3.3.1.3.), 2 ml GM (3.3.1.4.), 30 ml NM (3.3.1.5.), 20 ml AM (3.3.1.2.) a 10 ml PM (3.3.1.7.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.3 Základný zmesný roztok štandardov AM, GM, NM, PM, SM, STM, DSTM **AFC3** (1 mg/l vo vode)

Zobrať 1 ml zo zásobných roztokov štandardov AM, GM, NM, PM, SM, STM, DSTM (100 mg/l) (3.3.1.1.) – (3.3.1.7.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.4 Základný roztok štandardu STM **AFC4** (1 mg/l vo vode)

Zobrať 1 ml zo zásobného roztoku štandardu STM 100mg/l (3.3.1.1), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.2.5 Základný roztok štandardu DSTM **AFC5** (1 mg/l vo vode)

Zobrať 1 ml zo zásobného roztoku štandardu DSTM 100mg/l (3.3.1.3), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku deionizovanou vodou.

3.3.3 Pracovné roztoky štandardov

3.3.3.1 Zmesný roztok štandardov AM, GM, NM, PM, SM, STM, DSTM **AMC 1** (50 μg/l v 5 % kyseline trichlóroctovej)

Zobrať 5 ml zo základného roztoku štandardov AM, GM, NM, PM, SM, STM, DSTM - AFC3 (1 mg/l) (3.3.2.3.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku 5 % kyselinou trichlóroctovou. (3.2.3.)

Poznámka: Pracovný roztok použiť pri analýze svalu, obličky, pečene, mlieka.

3.3.3.2 Zmesný roztok štandardov STM, DSTM **AMC 2** (50 μg/l v zmesi 0,1% kyselina mravčia vo vode: 0,1% kyseliny mravčia v acetonitrile (30:70))

Zobrať 5 ml zo základného roztoku štandardu STM – AFC4 (1 mg/l) (3.3.2.4.) a 5 ml zo základného roztoku štandardu DSTM – AFC5 (1 mg/l) (3.3.2.5.), preniesť do 100 ml odmernej banky a doplniť po značku zmesou 0,1% kyselina mravčia vo vode:0,1% kyselina mravčia v acetonitrile (30:70)(3.2.13.)

Poznámka: Pracovný roztok použiť pri analýze medu.

Poznámka: Základné a pracovné roztoky štandardov sa pripravujú vždy čerstvé.

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 Heidolph
4.5 minishaker (Vortex)
4.6 odstredivka- Biofuge Stratos (Heraeus)
4.7 Termovap
4.8 pH meter Knick
4.9 centrifugačné teflónové nádobky 50 ml
4.10 odmerné sklo
4.11 odmerné sklo
4.12 striekačkový mikrofilter
4.13 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 s hmotnostným detektorom MSD Trap
4.14 chromatografická kolóna HILIC
4.15 SPE kolónky
4.16 filtračný papier Whatman 4
4.17 Hamilton stiekačka

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, 5 násobku ustanoveného MRL v prípade medov v 0.5, 1, 2 , 5 násobku detekčného limitu.

sval :
Navážiť 2 g homogenizovanej 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 5.3.1.

mlieko:

Navážiť 2 g homogenizovanej 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 5.3.1.

med:
Navážiť 5 g homogenizovanej 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 a 5.3.2.

Tabuľka 1 príprava fortifikovaných vzoriek svalu

Koncentrácia aminoglykozidov vo vzorke (µg/kg)				Prídavok roztoku (µl)
AM	GM	NM,PM, STM,DSTM	SM	AFC1
0	0	0	0	0
500	25	250	150	50
1000	50	500	300	100
2000	100	1000	600	200
5000	250	2500	1500	500

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek mlieka

Koncentrácia aminoglykozidov vo vzorke (µg/kg)					Prídavok roztoku (µl)
GM	NM	SM STM,DSTM	AM	PM	AFC2
0	0	0	0	0	0
50	750	100	500	250	50
100	1500	200	1000	500	100
200	3000	400	2000	1000	200
500	7500	1000	5000	2500	500

Tabuľka 3 Príprava fortifikovaných vzoriek medu

Koncentrácia aminoglykozidov AM,GM,NM,PM,SM,STM,DSTM vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku AFC3 (µl)
0	0
10	50
20	100
40	200
100	500

5.3 Príprava vzorky

5.3.1 Extrakcia sval, mlieko

Pridať 8 ml 5% kyseliny trichlóroctovej (3.2.3.). Skúmavku vložiť na 10 minút na trepačku. (nastaviť 100 ot./min) Centrifugovať po dobu 5 minút pri 14000 x g. Supernatant prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter do vialiek. Napichnúť na chromatografickú kolónu.

5.3.2 Extrakcia med

Pridať 20 ml fosfátového pufra (3.2.9.). Skúmavku vložiť na 10 minút na trepačku nastaviť 400 ot./min. alebo na Vortex 1minútu. Centrifugovať po dobu 10 minút pri 4000 x g a teplote 5 ^{0}C. Extrakt prefiltrovať cez filtračný papier Whatman 4, filter prepláchnuť s 2 ml fosfátového pufru (3.2.9). Upraviť pH extraktu s 30% hydroxidom sodným (3.2.11) na hodnotu 7,5. Centrifugovať 10 minút pri 4000 x g a teplote 5 ^{0}C. Extrakt prečistiť na SPE kolónke. Eluát odpariť na termovape do sucha pod prúdom dusíka pri teplote 40 – 50 ^{0}C. Rezíduá rozpustiť v 0,5 ml zmesi 0,1% kys. mravčia vo vode : 0,1% kys. mravčia v acetonitrile (30:70) (3.2.13.). Premiešať na Vortexe, centrifugovať 10 minút pri 4000 x g a teplote 5 ^{0}C. Prefiltrovať cez striekačkový mikrofilter (4.12), 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

LC-podmienky ACQUITY:

sval, mlieko (aminoglykozidy)
chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,3 ml/min
eluent : 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile / 0,1 % kyselina mravčia
gradientová elúcia
nástrek: 10 µl

med (streptomycín, dihydrostreptomycín)
chromatografická kolóna: HILIC
teplota: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,3 ml/min
eluent : 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile/ 0,1 % kyselina mravčia
gradientová elúcia
nástrek: 20 µl

LC podmienky Agilent:

med (streptomycín, dihydrostreptomycín)
chromatografická kolóna: HILIC
teplota: 30 ºC
prietok mobilnej fázy: 0,3 ml/min
eluent : 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile / 0,1 % kyselina mravčia
gradientová elúcia
nástrek: 20 µl

MS podmienky Quattro Premier:

Ionizačný mód: ESI pozitívna

Voltages:
Capillary (kV) : 1,8
Extractor (V): 6
RF Lens (V): 0

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

Gas Flow:
Desolvation (l/hr): 800
Cone (l/hr): 80

Analyser:
LM Resolution 1: 15
HM Resolution 1: 15
Ion Energy 1: 1
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 15
HM Resolution 2: 15
Ion Energy 2: 0,5

Tabuľka 4 Podmienky nastavenia MS/MS detekcie

Name	**RT** min	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
spectinomycín	1,60	351,2			
streptomycín	1,60	582,0	**263,1** 246,1	66	32 34
dihydrostreptomycín	1,60	584,1	**263,1** 246,0	57	31 40
paromomycín	1,60	616,3	**163,2** 293,4	46	37 25
apramycín	1,60	539	**115,9** 498 260,2	71	41 16 25
gentamycín	1,60	450,4 464,4 478,4	322,5	22 25 35	14
neomycín	1,60	615,4	**163,2** 293,4 455,4	40	41 23 22

Tabuľka 5 Podmienky nastavenia MS/MS detekcie med

Name	**RT** min	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
streptomycín	8,60	582,0	**263,1** 246,1	66	32 34
dihydrostreptomycín	8,60	584,1	**263,1** 246,0	57	31 40

MS podmienky LC MSD Ion Trap:

Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MRM

Tabuľka 6 Podmienky MS/MS detekcie med

Name	**segment**	**RT** min.	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Width** m/z	**Amplitude** **V**
streptomycín	2	10,6	600	**582**	4	0,30
dihydrostreptomycín	2	10,6	584	**263**	2	0,37

5.4.1 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok AMC. 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. Confirmation of aminoglycosides by HPLC – MS/MS, United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science 2003
3. Bohm, D. A.; Stachel, C. S.; Gowik, P.: Confirmatory Method for Determination of Streptomycin in Apples by LC-MS/MS. Poster in 4 th International Symposium Recent Advances in Food Analysis
4. Fügel, D., Anastassiades, M., Scherbaum, E.: Analysis of Kasugamycin in Fruit and Vegetables Using Ion Exchange SPE and LC-MS/MS. EPRW 2006.

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC – ultraúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
MSD Trap – hmotnostný detektor typu iónová pasca
MRL – maximálny reziduálny limit
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
MRM – multiple reaction monitoring
e.g. – napríklad
PFPA – kyselina pentafluoropropiónová
SPE – extrakcia na tuhej fáze