CH 11.7. STANOVENIE NATAMYCÍNU METÓDOU HPLC/MS

1 PRINCÍP METÓDY

Syr: natamycín sa zo zhomogenizovanej vzorky extrahuje metanolom. Po nariedení extraktu vodou sa koextrahované tuky a proteíny odstránia vymrazením vzorky a filtráciou. V prípade potreby je vzorka prečistená a zakoncentrovaná na SPE kolónke.
Víno: vzorka je po nariedení vodou prečistená a zakoncentrovaná na SPE kolónke.
Na analýzu sa použije chromatografická kolóna s obrátenými fázami, prítomnosť natamycínu sa deteguje hmotnostným detektorom Time of flight (HPLC/MS), Quattro Premier XE alebo MSD Trap (HPLC/MS/MS). Použitá ionizácia je ESI v pozitívnom móde. Identifikácia látky je prevedená z Full Scan spectra pre TOF a dvoma tranzíciami (2 transitions) s kontrolou ich iónových pomerov (ion ratio) u Quattro Premier XE a MSD Trap. Identifikácia hľadaných m/z v spektre sa považuje za kvalitatívne potvrdenie prítomnosti hľadaného liečiva. Kvantifikácia je prevedená metódou externej kalibrácie s použitím matricovej kalibračnej krivky.

2 POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Metóda je použiteľná na stanovenie natamycínu v syre, jogurte a víne.

3 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

3.1 Čisté chemikálie

3.1.1 Delvocid– (DE)
3.1.2 Natamycin =Pimaricin (NA)
3.1.3 metanol HPLC gradient grade
3.1.4 metanol LC-MS CHROMASOLV
3.1.5 acetonitril CHROMASOLV HPLC gradient grade
3.1.6 mravčan amónny puriss p.a.
3.1.7 kyselina mravčia puriss p.a. pre LC-MS
3.1.8 2-propanol LC-MS CHROMASOLV
3.1.9 kyselina octová puriss p.a. pre LC-MS
3.1.10 hydroxid sodný purum p.a.
3.1.11 octan amónny extra čistý bezvodý
3.1.12 kyselina mravčia
3.1.13 deionizovaná voda

3.2 Roztoky a reagencie

3.2.1 0,1M mravčan amónny
3.2.2 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia vo vode (mobilná fáza A1- TOF)
3.2.3 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia v metanole (mobilná fáza B1-TOF)
3.2.4 1 M hydroxid sodný
3.2.5 10mM mravčan-octan sodný (kalibračný roztok TOF)
3.2.6 1 M octan amónny
3.2.7 0,01 M octan amónny
3.2.8 0,1 % kyselina mravčia v acetonitrile
3.2.9 0,1 % kyselina mravčia

3.3 Štandardné roztoky

3.3.1 Základné roztoky štandardov

3.3.1.1 Základný roztok štandardu natamycinu (1000mg/l) NA1000
Navážiť 100 mg natamycinu (NA)(3.1.2) do 100ml odmernej banky, rozpustiť v metanole (3.1.3), doplniť po rysku metanolom (3.1.3), premiešať.

3.3.2 Pracovné roztoky štandardov

3.3.2.1 Pracovný roztok štandardu natamycin (1mg/l) **NA 1**
Pipetovať 100 µl zo základného roztoku štandardu natamycínu NA 1000 (3.3.1.1) do 100ml odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.13), premiešať.

3.3.2.2 Pracovný roztok štandardu natamycin (100µg/l) **NA 2**
Preniesť 10 µl zo základného roztoku štandardu natamycinu NA 1000 (3.3.1.1) do 100ml odmernej banky, doplniť po rysku deionizovanou vodou (3.1.13), premiešať.

4 PRÍSTROJE A POMÔCKY

4.1 kvapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s hmotnostným detektrorom – MSD Trap Bruker-Gemini
4.2 kvapalinový chromatograf Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Time of Flight Bruker (TOF)
4.3 kvapalinový chromatograf Acquity UPLC s hmotnostným detektorom Micromass Quattro Premier XE
4.4 chromatografická kolóna : C18
4.5 chromatografická kolóna: UPLC C18
4.6 pumpa KNAUER
4.7 laboratórny mixér
4.8 analytická váha HELAGO HM 200
4.9 ultrazvukový kúpeľ
4.10 trepačka Heidolph Unimax 1010

4.11 mraznička -18 °C - -20 °C
4.12 laboratórne odmerné sklo: 100, 250, 500 a 1000 ml odmerná banka, 250 ml odmerný valec, 1 a 5 ml pipety
4.13 laboratórne sklo: 100, 250 ml Erlenmayerova banka
4.14 filter Whatman 4
4.15 striekačkové mikrofiltre
4.16 SPE kolónky

5 PRACOVNÝ POSTUP

5.1 Predpríprava vzoriek

Vzorka syra sa spracuje podla normy ISO 9233-2 (IDF 140-2) nasledovne:
1./ kôra syra: z bloku syra sa odreže kôra o hrúbke maximálne 5mm o ploche 2 – 4 dm^2. Pre kvantitatívne stanovenie natamycinu sa vypočíta plocha v dm^2 a odváži sa hmotnosť kôry v kg. Vzorku kôry zhomogenizovať.
2./ 1mm vrstva syra za kôrou: po odrezaní kôry odrezať 1mm vrstvu syra a dokonale zhomogenizovať.

Poznámka:
Po odrezaní a zhomogenizovaní každej vzorky syra, použité pomôcky (nôž, mixér) dôkladne umyť horúcou vodou, prepláchnuť metanolom a vysušiť prúdom dusíka.

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 na vybraných úrovniach (Tabuľka 1, Tabuľka 2, Tabuľka 3).

5.2.1.1 Syr

Navážiť 5 g homogenizovanej vzorky do 100 ml Erlenmayerovej banky. Pridať roztok štandardu podľa tabuľky 1. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.1.1.

Tabuľka 1 Príprava fortifikovaných vzoriek syra

Koncentrácia natamycínu vo vzorke (mg/kg)	Prídavok roztoku NAT 1000 (µl)
0	0
10	50
20	100
30	150
40	200

5.2.1.2 Víno

Navážiť 10 g vína do 50 ml odmernej banky. Pridať roztok štandardu podľa tabuľky 2. Doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.13). Premiešať na Vortexe. Nechať postáť a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.2.1

Tabuľka 2 Príprava fortifikovaných vzoriek vína

Koncentrácia natamycínu vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku NA1 (µl)
0	0
5	50
10	100
20	200
50	500

5.2.1.3 Jogurt

Navážiť 5 g homogenizovanej vzorky do 100 ml odmernej banky. Pridať roztok štandardu podľa tabuľky 3. Zmixovať na Vortexe. Nechať postáť 15 minút a pokračovať podľa procedúry od bodu 5.3.1.1.

Tabuľka 3 Príprava fortifikovaných vzoriek jogurtu

Koncentrácia natamycínu vo vzorke (µg/kg)	Prídavok roztoku NA1 (µl)
0	0
5	25
10	50
20	100
50	250

5.3 **Príprava vzorky**

5.3.1 Syr
syr kôra, syr 1mm vrstva:
Navážiť 5g zhomogenizovanej vzorky kôry syra do 100 ml Erlenmayerovej banky.
Navážiť 5g zhomogenizovanej vzorky 1mm vrstvy syra do 100 ml Erlenmayerovej banky.

5.3.1.1 Extrakcia
Pridať 50 ml metanolu (3.1.3) a trepať na trepačke 90 minút. Pridať 25 ml deionizovanej vody (3.1.13) a vložiť do mrazničky pri teplote –18°C - -20 ^{o}C na 60 minút. Po vytiahnutí vzorky z mrazničky prefiltrovať cez filtračný papier Whatman 4 (4.14), pričom prvý podiel filtrátu treba vyhodiť (5ml).

V prípade zakoncentrovania vzorky s použitím SPE pokračovať podľa 5.3.1.2.
V prípade bez zakoncentrovania vzorky pokračovať podľa 5.3.1.3.

5.3.1.2 Zakoncentrovanie vzorky na SPE kolónke

Zobrať 50 ml filtrátu, nariediť so 100 ml deionizovanej vody (3.1.13) a prečistiť na SPE kolónke. Eluát prefiltrovať cez striekačkový filter.

5.3.1.3 Vzorka bez zakoncentrovania

Filtrát získaný po filtrácii na Whatmane 4 prefiltrovať cez striekačkový filter.

Pripravená vzorka kôry syra a pripravená vzorka 1mm vrstvy syra za kôrou sa injektuje na chromatografickú kolónu.

5.3.2 Víno

Navážiť 10 g vína do 50 ml odmernej banky, doplniť po značku deionizovanou vodou (3.1.13). Nariedenú vzorku a prečistiť na SPE kolónke. K eluátu pridať 2,5 ml deionizovanej vody, premiešať. Nariedený eluát prefiltrovať cez striekačkový filter.

5.3.3 Jogurt

Navážiť 5g homogenizovanej vzorky jogurtu do 100 ml Erlenmayerovej banky.

5.3.3.1 Extrakcia
Pridať 50 ml metanolu (3.1.3) a trepať na trepačke 90 minút. Pridať 25 ml deionizovanej vody (3.1.13) a vložiť do mrazničky pri teplote –18°C - -20 ^{o}C na 60 minút. Po vytiahnutí vzorky z mrazničky prefiltrovať cez filtračný papier Whatman 4 (4.14), pričom prvý podiel filtrátu treba vyhodiť (5ml).

5.3.3.2 Zakoncentrovanie vzorky na SPE kolónke

Zobrať 50 ml filtrátu, nariediť so 100 ml deionizovanej vody (3.1.13) a prečistiť na SPE kolónke. Eluát nariediť s 1ml deionizovanej vody (3.1.13). Prefiltrovať cez striekačkový filter.

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

5.4 **Chromatografická analýza**

5.4.1 LC/ MSD Trap

5.4.1.1 HPLC podmienky

chromatografická kolóna: C18
teplota: 30 ºC
prietok: 0,6 ml/mn
eluent : **B:** Acetonitril / **C:** 0,01M octan amónny
gradientová elúcia
nástrek: 50 µl

5.4.1.2 MS podmienky LC/MSD Trap

Ionizačný mód: ESI pozitívna
Detekčný mód: MSn

Tabuľka 4 Podmienky MS/MS detekcie

Analyt	**segment**	**RT** (min.)	**Width** m/z	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Amplitude** (V)
natamycín	2	6,7	4	648	**485**, 467, 630, 449	0,42

5.4.2 UPLC/ TOF

5.4.2.1 UPLC podmienky

chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 ºC
prietok: 0,2 ml/min
eluent : **B1:** 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia v metanole /
A1: 1mM mravčan amónny +0,002% kyselina mravčia vo vode
gradientová elúcia
nástrek: 10 µl

5.4.2.2 MS podmienky TOF

ionizácia: ESI pozitívna
End Plate Offset: - 500V
Capillary: -4500V
Capillary Exit: 100V
Skimmer 1: 50V
Hexapole 1: 23V
Hexapole RF: 300Vp
Skimmer 2: 22V
Lens1 Transfer: 52 us
Lens 1 Pre Puls Storage: 9us

Nebuliser: 2,0 bar
Dry Gas: 9,0 l/min
Dry Temp: 200°C
Mass Range: 100-1000m/z
Rolling Average: On
Spectra Rate: 1 Hz
Focus: No

Segmenty: 1. segment: 0,02 – 0,07 min. to Source
2. segment: 0,07 – 0,24 min. to Waste (kalibračný)
3. segment: 0,24 – 11 min. to Source (merací)

Kalibrácia:
kalibračný roztok: 10mM NaFormate Acetate
Reference Mass List: NaFormiateAcetate Pos(90-1000)4500V
Calibration Mode: HPC calibration

Tabuľka 5 Podmienky MS detekcie

Analyt	**RT** min.	**Sledované EIC± 0,005 m/z**
natamycín	7,14	**666,3110**; 503,2258; 371,3150

5.4.3 UPLC Quattro Premier XE

5.4.3.1 UPLC podmienky

chromatografická kolóna: UPLC C18
teplota: 30 ºC
prietok: 0,3 ml/min
eluent : **B1:** 0,1% kyselina mravčia v acetonitrile
A1: 0,1% kyselina mravčia vo vode
gradientová elúcia

5.4.3.2 MS podmienky

Voltages:
Capillary (kV) : 2,0
Extractor (V): 4
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: 0,5
Entrance: 0
Exit: 1
LM Resolution 2: 13,5
HM Resolution 2: 13,5
Ion Energy 2: 0,5

Tabuľka 6 MS podmienky Quattro Premier XE

Analyt	**RT** (min.)	**Precursor** m/z	**Product** m/z	**Cone** V	**Collision** eV
natamycín	3,18	666,1	503,1 648,2	20	12 11

5.4.4 Iniciačný test

Nainjektovať na chromatografickú kolónu roztok NA2 (natamycín 100µg/l). Skontrolovať pomer signálu ku šumu produkovaných iónov. Pomer by mal byť vyšší ako 6.

6 VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV MERANIA

MSD Trap

Kvalitatívne meranie:

Vo vzorke sa sleduje prítomnosť rodičovského iónu a dcérskych iónov natamycínu. Pri identifikovaní sledovaných m/z vo vzorke je vo vzorke potvrdená prítomnosť natamycínu. Zhodnosť spektra sa porovná so vzorkami pozitívnej a negatívnej kontroly.

Kvantitatívne meranie:

Vo vzorke sa sleduje prítomnosť rodičovského iónu a dcérskych iónov natamycínu. Zhodnosť spektra sa porovná so vzorkami pozitívnej a negatívnej kontroly.

Koncentrácia natamycínu v mg. kg^{-1} sa určí metódou externej matricovej kalibrácie. Prepočet koncentrácie v mg. kg^{-1}na koncentráciu v $mg.dm^{-2}$ sa uskutoční podľa vzťahu:

$$c(A) = c \times \frac{m}{A}$$

c(A) – koncentrácia natamycínu ($mg.dm^{-2}$)

c - koncentrácia natamycínu (mg. kg^{-1})

A – plocha kôry syra, ktorá bola zhomogenizovaná

m – hmotnosť kôry syra, ktorá bola zhomogenizovaná

TOF:

Kvalitatívne meranie:

Z nameraného Full Scan Spectra sa vyextrahujú sledované EIC s presnosťou 0,005.

Pri identifikovaní sledovaných m/z vo vzorke je vo vzorke potvrdená prítomnosť natamycínu.

Zhodnosť spektra sa porovná so vzorkami pozitívnej a negatívnej kontroly.

Kvantitatívne meranie:

Z nameraného Full Scan Spectra sa vyextrahujú sledované EIC s presnosťou 0,005.

Zhodnosť spektra sa porovná so vzorkami pozitívnej a negatívnej kontroly.

Koncentrácia natamycínu v mg. kg^{-1} sa určí metódou externej matricovej kalibrácie. Prepočet koncentrácie v mg. kg^{-1}na koncentráciu v $mg.dm^{-2}$ sa uskutoční podľa vzťahu:

$$c(A) = c \times \frac{m}{A}$$

c(A) – koncentrácia natamycínu ($mg.dm^{-2}$)

c - koncentrácia natamycínu (mg. kg^{-1})

A – plocha kôry syra, ktorá bola zhomogenizovaná

m – hmotnosť kôry syra, ktorá bola zhomogenizovaná

Quattro Premier XE

<u>Kvantifikácia – metóda externej kalibrácie</u>

Koncentrácia zložky je úmerná hodnotám plochy píkov. Koncentráciu zložky možno vypočítať dosadením plochy píku zložky do rovnice kalibračnej krivky pre dané stanovenie .

$$c_s = \frac{A - b}{a}$$

A – plocha píku

b – úsek z rovnice kalibračnej krivky
a – smernica z rovnice kalibračnej krivky

$c_V = c_S \cdot R$ (mg/kg)

c_V - koncentrácia analytu v mg/kg
c_S - koncentrácia analytu určená z kal.krivky (mg/l)

R - stupeň riedenia

.

7 LITERATÚRA

1. International Standard ISO 9233-2 (IDF 140-2): Cheese, cheese rind and processed cheese –Determination of natamycin content, Part 2: High-performance liquid chromatographic method for cheese, cheese rind and processed cheese
2. Louis G. M. TH.Tuinstra; Wim A. Traag: Liquid Chromatographic Determination of Natamycin in Cheese at Residue Levels. Journal Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 65, No 4, 1982.
3. K. Rybinska, J. Postupolski, M. Szczesna: Determination of Natamycin Residues in Ripening Cheeses by High-Performance Liquid Chromatography. Roczn.Pzh, 1997, 48, Nr. 2

8 ZOZNAM SKRATIEK

HPLC - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC – ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia
MS/MS- hmotnostná detekcia s minimálne dvoma tranzíciami
RT – retenčný čas
ESI – electrospray ionisation
MSn – single reaction monitoring
TOF – detektor Time of Flight
MSD Trap – hmotnostný detektor typu Iónová pasca
HPC – kalibračný mod high precision calibration
DA – Data Analysis
EIC – extrahovaný iónový chromatogram
e.g. - napríklad