

AMINOGLYKOSID-ANTIBIOTIKA



Aminoglykosid-Breitband-Antibiotika, im wesentlichen Streptomycin, Gentamycin, Apramycin und Neomycin, werden sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. Streptomycin wird zudem als Pflanzenschutzmittel unter dem Handelsnamen Plantomycin gegen Feuerbrand bei Kernobst verwendet. Dabei wird es während der Blütezeit angewendet und gelangt über den Pollen in den Honig. Rückstände von Aminoglykosid-Antibiotika in Lebensmitteln können eine potentielle gesundheitliche Gefahr darstellen.

Für die Analytik von Aminoglykosid-Antibiotika (Gentamycin, Apramycin, Neomycin und Streptomycin) bietet PICKERING Folgendes:

Neben einem professionellen System zur Nachsäulenderivatisierung, dem Pinnacle PCX, erhalten Sie auch ein komplettes Applikationskit. Dieses Kit

enthält neben der HPLC-Säule auch Reagenzien, Diluenten und Eluenten.

Die Konfiguration des Pinnacle PCX (Anzahl der Reagenzpumpen, Reaktorvolumen, etc.) ist je nach Derivatisierungsmethode unterschiedlich.

Methodenbeschreibung

Gentamycin, Apramycin und Neomycin reagieren spontan mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) und Thiofluor[®] (2-Mercapoethanolderivat) zu fluoreszierenden Isoindolderivaten. Die Trennung kann entweder auf der speziellen Pickering-Ionenaustauschersäule erfolgen oder auf einer Reversed-Phase-Säule (je nach Literatur).

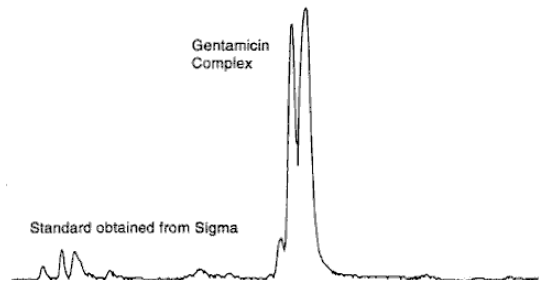
Für die Derivatisierung von Streptomycin stehen verschiedene Methoden zur Verfügung! Häufig verwendet wird ebenfalls eine Methode mit OPA/Thiofluor angewendet, wie Sie auch oben beschrieben wird, oder alternativ wird als Derivatisierungsreagenz 0.75 N Na-Hydroxid-Lösung und 0.6% Ninhydrin verwendet!

Extraktion:

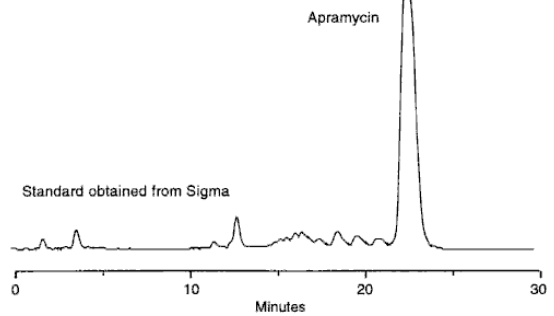
Es werden ein Teil Probe :10 Teile Extraktionslösung (w/v) (Art. Nr. 1700-1118) verwendet und 5 Minuten homogenisiert. Anschließend findet eine 10-minütige Zentrifugation statt. Dabei bilden sich drei Schichten: ein Niederschlag, eine überstehende Emulsion und eine dünne Schicht von schwimmenden Fett. Mit einem Spatel wird die Fettschicht vorsichtig entnommen und verworfen. Die Emulsion wird in ein verschließbares Fläschchen transferiert. Die Emulsion wird koaguliert, indem man das Fläschchen für 15 Minuten in kochendes Wasser gibt. Anschließend wird für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird filtriert (0.45 um Nylon) und das Filtrat wird in ein GC-Vial überführt.

Chromatogramme

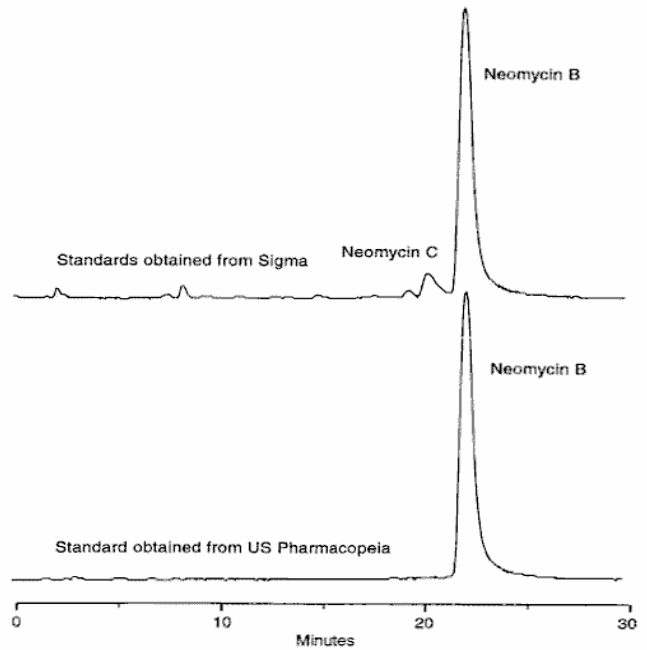
Chromatogramm eines Gentamycin-Standards
5 µg Gentamycin-Komplex abs.



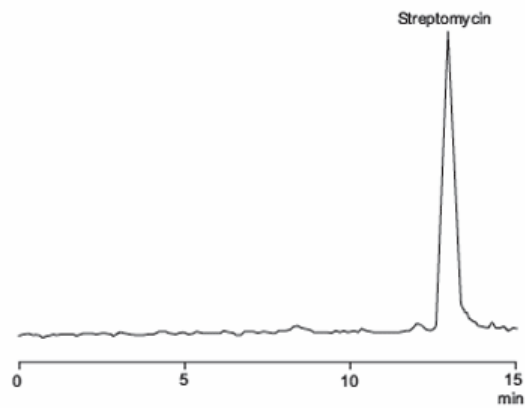
Chromatogramm eines Apramycin-Standards
11,1 nmol Apramycin abs.



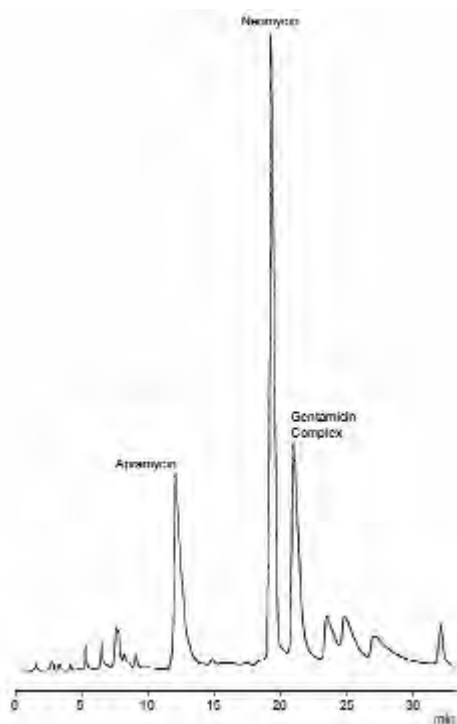
Chromatogramm eines Neomycin-Standards
2,75 nmol Neomycin abs.



Chromatogramm eines Streptomycin-Standards



Chromatogramm von Apramycin, Gentamycin und Neomycin in einem Lauf



HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

Apramycin, Gentamycin und Neomycin

HPLC	
Betriebsmodus	Ternärer Gradient
Eluent	A: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 (1700-1101) B: 0,1 M Kaliumhydroxidlösung, pH 13,0 (1700-1102) C: 1,0 M Kaliumchloridlösung (1700-1103)
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	ALKION® Kationenaustauschersäule, K ⁺ -Form
Flussrate	0,8 mL/min
Injektionsvolumen	10 µl
Nachsäulenderivatisierung	
Pinnacle PCX	Einstufig; 150 µL Reaktor
Säulenofen	40 °C bzw. 50 °C
Reaktorvolumen	150 µL
Reaktortemperatur	45 °C
Reagenz	Lösung von o-Phthalaldehyd (OPA) und Thiofluor® in OD104-Diluent (300 mg OPA, 2 g Thiofluor und 3ml 30% Brij® 35 in 950ml Diluent)
Reagenzfluss	0.3 mL/min
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis mindestens 7 bar

Hinweis: die Verwendung einer RP-Säule und/oder anderer Laufmittel hat keinen Einfluss auf die Konfiguration des Pickering Systems!

Achtung: Extremer pH-Bereich!

Folgende Hinweise gelten nur bei Verwendung des Pickering-Kits!

Wegen des alkalischen Regeneranten (pH 13) dürfen keine Teile aus Vespel im HPLC-System vorhanden sein, sondern müssen gegen Teile aus pH-inertem Material (Tefzel oder PEEK) ausgetauscht werden. Kontaktieren Sie dazu Ihren LC-Außendienst oder ziehen Sie Ihr Handbuch zu Rate. Eine inerte Ausführung (Titan, PEEK) der HPLC-Anlage ist nicht notwendig, eine Kolbenhinterspülung der Pumpenköpfe aber empfehlenswert. Um Korrosion der Anlage und Kontamination der Ionenaustauschersäule mit Metallionen zu vermeiden, empfiehlt es sich vor allem ältere HPLC-Systeme zu passivieren. Kontaktieren Sie dazu Ihren LC-Außendienst oder ziehen Sie Ihr Handbuch zu Rate.

Gradientenprogramme

Bestimmung von Gentamycin

ZEIT [min]	1700-1101 %	1700-1102 %	1700-1103%
0	43	31	26
20	9	13	78
30	9	13	78
30.1	0	22	78
31	0	22	78
31.1	43	31	26
38	43	31	26

Säulentemperatur: 40°C

Bestimmung von Neomycin

ZEIT [min]	1700-1101 %	1700-1102 %	1700-1103%
0	60	40	0
15	13.2	8.8	78
25	11	11	78
25.1	0	22	78
26	0	22	78
26.1	60	40	0
32	60	40	0

Säulentemperatur: 40°C

Bestimmung von Apramycin

ZEIT [min]	1700-1101 %	1700-1102 %	1700-1103%
0	67	33	0
5	67	33	0
15	14.7	7.3	78
20	14.7	7.3	78
20.1	0	22	78
21	0	22	78
21.1	67	33	0
28	67	33	0

Säulentemperatur: 40°C

APPLIKATIONSNOTE

Simultane Bestimmung von Apramycin, Gentamycin und Neomycin

ZEIT [min]	1700-1101 %	1700-1102 %	1700-1103%
0	60	40	0
15	13.2	8.8	78
15.1	12	10	78
30	12	10	78
30.1	0	22	78
31	0	22	78
31.1	60	40	0
37	60	40	0

Säulentemperatur: 50°C

HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

Streptomycin – 1. Möglichkeit

HPLC	
Betriebsmodus	Ternärer Gradient
Eluent	A: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 (1700-1101) B: 0,1 M Kaliumhydroxidlösung, pH 13,0 (1700-1102) C: 1,0 M Kaliumchloridlösung (1700-1103)
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	ALKION® Kationenaustauschersäule, K ⁺ -Form
Flussrate	0,8 mL/min
Injektionsvolumen	Bis zu einigen µl
Nachsäulenderivatisierung	
Pinnacle PCX	Zweistufig
Säulenofen	40°C
Reaktorvolumen	1. Reaktor: 0.1 ml (RT); 2. Reaktor. 0.5 ml
Reaktortemperatur	60°C (2. Reaktor)
Reagenz	1. Reagenz: 0.75 N Na-Hydroxid-Lösung 2. Reagenz: 0.6% Ninhydrin (Trione)
Reagenzfluss	0,3 mL/min
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	395 nm
Emissionswellenlänge	500 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis mindestens 7 bar

Streptomycin – 2. Möglichkeit

HPLC	
Betriebsmodus	Ternärer Gradient
Eluent	A: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 (1700-1101) B: 0,1 M Kaliumhydroxidlösung, pH 13,0 (1700-1102) C: 1,0 M Kaliumchloridlösung (1700-1103)
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	ALKION® Kationenaustauschersäule, K ⁺ -Form
Flussrate	0,8 mL/min
Injektionsvolumen	Bis zu einigen µl
Nachsäulenderivatisierung	
Pinnacle PCX	Zweistufig
Säulenofen	40°C
Reaktorvolumen	1. Reaktor:0.5ml; 2. Reaktor. 0.1 ml (RT)
Reaktortemperatur	50 °C (1. Reaktor)
Reagenz	1. Reagenz: 100µl 5% Na-Hypochlorid-Lösung in GA116 2. Reagenz: Lösung von o-Phthalaldehyd (OPA) und Thiofluor® in OD104-Diluent (300 mg OPA, 2g Thiofluor und 3ml 30% Brij® 35 in 950ml Diluent)
Reagenzfluss	0,3 mL/min
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis mindestens 7 bar

Systeme für die Nachsäulenderivatisierung

Bestellnummer	Beschreibung
1153-1012	PINNACLE PCX; einstufig, 150 µL Reaktor
1153-1052	PINNACLE PCX; zweistufig, 500 µL Reaktor

Chemikalien

Applikationen-Kit

Bestellnummer	Beschreibung
0352-0041	Applikationenkit für die Analytik von Gentamycin, Neomycin, Apramycin und/oder Streptomycin:
9410917	ALKION [®] , Ionenaustauschersäule, K ⁺ -Form, 4 x 150 mm
9493020	Vorsäule, 3 x 20 mm, für Säule 9410917
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade TM ", 5 g
OD104	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade TM ", 4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor [®] , "Chromatographic Grade TM ", 10 g
1700-1101	Kaliumphosphat/Boratpuffer, 0,1 M, pH 6,0, 4 x 950 mL
1700-1102	Kaliumhydroxidlösung, 0,1 M, 4 x 950 mL
1700-1103	Kaliumchloridlösung, 1,0 M, pH 6,0, 4 x 950 mL

Trennsäule für die Analytik von Aminoglykosid-Antibiotika

- 1) Speziell für die Analytik von Aminoglykosid-Antibiotika entwickelt
- 2) Hohe Auflösung und Präzision
- 3) Retentionszeiten unabhängig von Matrixeffekten

Die PICKERING-Säule ALKION[®] ist eine Kationenaustauschersäule (K⁺-Form), die speziell für die Analytik von Aminoglykosidantibiotika entwickelt wurde.

Die angebotene Vorsäule ist mit dem gleichen Ionenaustauschermaterial gefüllt und wird nach gleichen Kriterien wie die analytische Säule getestet.

Bestellnummer	Beschreibung
9410917	ALKION [®] , Ionenaustauschersäule, K ⁺ -Form, 4 x 150 mm
9493020	Vorsäule, 3 x 20 mm, für Säule 9410917

o-Phthalaldehyd Reagenz

Aminoglykosid-Antibiotika bilden mit o-Phthalaldehyd (OPA) und einem Thioalkohol (Mercaptan) im alkalischen Milieu stark fluoreszierende Isoindol-Derivate. Bei Raumtemperatur ist diese Reaktion bei einem pH-Wert von 9-10 normalerweise innerhalb von ca. 30 sec abgeschlossen. Um eine maximale Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten, ist es notwendig, hochreine Chemikalien zu verwenden und die sauerstoffempfindliche OPA-Reagenzlösung ständig unter Inertgasatmosphäre zu halten. Es ist daher aber auch wichtig, nicht nur das Reagenzreservoir unter Inertgas zu halten sondern auch luftundurchlässige Gas- und Reagenzleitungen aus Saran® oder PEEK zu verwenden. Die so aufbewahrte Reagenzlösung kann bis zu 10 Tagen verwendet werden, ohne dass sich das Signal/Rauschverhältnis ändert.

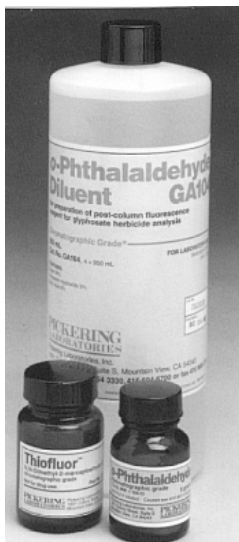
Für die o-Phthalaldehyd-Reagenzlösung bietet PICKERING an:

- 1) Hochreines, kristallines OPA
- 2) Boratdiluent; garantiert frei von Aminen und Schwermetallen
- 3) Thiofluor®; ein kristallines 2-Mercaptoethanolderivat

o-Phthalaldehyd

Bestellnummer	Beschreibung
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade™", 5 g

o-Phthalaldehyd Diluent



Für die Aminoglykosid-Antibiotika-Analytik bietet Pickering einen Na-Boratpuffer mit pH 10,4 an, der auch saure Eluenten abpuffert.

Bestellnummer	Beschreibung
OD104	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade™", 4 x 950 mL

Thiofluor[®]

Thiofluor[®] der Firma PICKERING ist ein kristallines, schwer flüchtiges Nukleophil. Seine mit OPA und primären Aminen gebildeten Isoindol-Derivate sind bei gleichen Fluoreszenzeigenschaften stabiler als die des üblicherweise verwendeten 2-Mercaptoethanols.

Bestellnummer	Beschreibung
3700-2000	Thiofluor [®] , "Chromatographic Grade TM ", 10 g

Kaliumphosphateluenten

- 1) Eluenten für die Elution von Aminoglykosid-Antibiotika
- 2) Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- 3) Vorfiltriert, gebrauchsfertig
- 4) Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Diese Puffer werden für die Stufenelution von Aminoglykosid-Antibiotika gemäß der Methode von PICKERING verwendet. Eine Flasche mit 950 mL reicht für über 100 Analysen.

Bestellnummer	Beschreibung
1700-1101	Kaliumphosphat/Boratpuffer, 0,1 M, pH 6,0, 4 x 950 mL
1700-1102	Kaliumhydroxidlösung, 0,1 M, 4 x 950 mL
1700-1103	Kaliumchloridlösung, 1,0 M, pH 6,0, 4 x 950 mL

Literatur

Neomycin

B. Shaikh, E. H. Allen, J. C. Gridley, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1985**, 68 (1), 29 – 36.

Gentamycin

D. Guggisberg, H. Koch, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **1995**, 86, 14 – 28.

Streptomycin

- 1) U. Kocher, *Lebensmittelchemie* **1996**, 50, 112 – 115.
- 2) G. C. Gerhardt, C. D. C. Salisbury, J. D. MacNeil, *J. AOAC International* **1994**, 77 (2), 334 – 336.