

Medicijnresten en hormonen in luiermateriaal

INHOUD

1	Doel en toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Apparatuur en materiaal	4
4	Reagentia en standaarden	4
5	Monsterbewaring en -voorbehandeling	6
6	Analyseprocedure	6
6.1	<i>Extractie</i>	6
6.2	<i>LC-MS/MS analyse</i>	7
6.2.1	LC-condities	7
6.2.2	MS-condities	8
6.2.3	Identificatie en integratie	10
6.2.4	Kalibratie	11
7	Berekeningen	12
8	Kwaliteitscontrole	13
8.1	<i>Instrumentele detectielimiet (IDL)</i>	13
8.2	<i>Procedureblanco</i>	13
8.3	<i>Controle van de geldigheid van de kalibratievergelijking</i>	13
8.4	<i>Terugvinding van de isotoopgemerkte verbindingen</i>	13
8.5	<i>Controlemonster en matrixadditie</i>	14
9	Prestatiekenmerken	14
10	Referenties	14

1 DOEL EN TOEPASSINGSGBIED

Deze procedure beschrijft de kwantitatieve bepaling van geselecteerde medicijnresten en hormonen in gerecycleerde luiermaterialen (cellulose, superabsorberend polymeer en plastic) en bodemverbeterend middel (outputstroom van vergister) met behulp van vloeistofchromatografie tandem massaspectrometrie (LC-MS/MS).

De analyse gebeurt in het kader van de toetsing aan einde-afval criteria die voor deze materialen zijn gedefinieerd. De limietwaarde bedraagt 250 µg/kg ds voor elke medicijnrest en 200 µg/kg ds voor elk hormoon. Deze limietwaarden zijn gebaseerd op wat veilig wordt geacht en wat analytisch met hoge nauwkeurigheid meetbaar is.

De volgende verbindingen worden met deze methode bepaald:

<i>Medicijnen</i>	<i>CAS nr</i>
Allopurinol	315-30-0
Carbamazepine	298-46-4
Clarithromycine	81103-11-9
Gabapentine	60142-96-3
Metformine	657-24-9
Metoprolol	37350-58-6
Sotalol	3930-20-9
Sulfamethoxazol	723-46-6
Trimethoprim	738-70-5
Diclofenac	15307-86-5
5-Fluorouracil	51-21-8
Hydrochloorthiazide	58-93-5
Ibuprofen	15687-27-1
Naproxen	22204-53-1
<i>Hormonen</i>	<i>CAS nr</i>
Estriol	50-27-1
Estrone	53-16-7

2 PRINCIPE

Aan de stalen worden gekende hoeveelheden isotoop gemerkte farmaceutica toegevoegd. De stalen worden vervolgens geëxtraheerd met een geschikt solvent en de extracten worden afhankelijk van de matrix ingedampt, waarna het ingedampte residu wordt opgenomen in een gekend volume mobiele fase. De extracten worden geanalyseerd met vloeistofchromatograaf gekoppeld aan een tandem massaspectrometrische detector. Het gehalte van de farmaceutica wordt berekend met de interne standaard methode of de standaardadditie methode.

3 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 3.1** Analytische balans met een afleesnauwkeurigheid van 0,1 mg
- 3.2** Bovenweger met een afleesnauwkeurigheid van 0,01 g
- 3.3** Schudtoestel
- 3.4** Vortexmenger
- 3.5** Centrifuge-toestel
- 3.6** Eenheid voor indampen onder stikstofstroom met regelbaar debiet
- 3.7** Polypropyleen centrifugebuizen van bv. 50 ml en 15 ml
- 3.8** Polyamidefilters 0.20 µm
- 3.9** Meetvials van 1,5 ml
- 3.10** LC-MS systeem bestaande uit:
- Een ultra high performance vloeistofchromatograaf (UHPLC) met injectie-automaat, vloeistofpomp, gethermostatiseerde kolom en ontgassingseenheid.
 - Een tandem quadrupool massaspectrometer (MS/MS) met electrospray ionisatiekamer
 - Een datastation voor de instelling van de instrumentele condities, de data-acquisitie en de data-analyse
- 3.11** UPLC-kolom, bv. Waters Acquity UPLC HSS T3, 1.8 µm, 2.1x100 mm
Opn.: HPLC systemen en kolommen kunnen ook gebruikt worden indien validatieresultaten aantonen dat hiermee betrouwbare resultaten bekomen worden
- 3.12** Ultrasoonbad

4 REAGENTIA EN STANDAARDEN

- 4.1** Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), aceton, dimethylsulfoxide: residukwaliteit
- 4.2** Water: ultrapuur (Milli-Q)
- 4.3** Ammoniumformaat p.a.
- 4.4** Mierenzuur p.a.
- 4.5** Stock oplossingen van natieve verbindingen: maak van elke verbinding een afzonderlijke oplossing in een concentratie van ca 1000 µg/g in bijvoorbeeld volgende solventen:

Allopurinol	DMSO
Carbamazepine	Aceton
Claritromycine	Aceton
Gabapentine	MeOH
Metformine	MeOH
Metoprolol	MeOH
Sotalol	MeOH
Sulfamethoxazol	Aceton
Trimethoprim	DMSO
Diclofenac	DMSO
5-Fluorouracil	DMSO
Hydrochloorthiazide	Aceton
Ibuprofen	MeOH
Naproxen	Aceton
Estriol	Aceton
Estrone	Aceton

- 4.6** Stock mengstandaarden van natieve verbindingen: maak uitgaande van de individuele stockstandaarden (4.5) 2 afzonderlijke mengstandaarden van 10 µg/g met ACN als verdunningssolvent:

<i>Stock ESI+</i>	<i>Stock ESI-</i>
Allopurinol	Diclofenac
Carbamazepine	Hydrochloorthiazide
Claritromycine	Ibuprofen
Gabapentine	Naproxen
Metformine	Estriol
Metoprolol	Estrone
Sotalol	
Sulfamethoxazol	
Trimethoprim	

- 4.7** Stock oplossingen van isotoop aangerijkte verbindingen (inwendige standaarden): maak uitgaande van zuivere producten of aangekochte oplossingen individuele oplossingen van 150 - 800 µg/g in de bovenvermelde solventen. De volgende isotoopgemerkte verbindingen worden gebruikt:

<i>Verbinding</i>	<i>µg/g</i>
d2-allopurinol	500
d2-carbamazepine	300
d3-claritromycine	150
d4-gabapentine	300
d6-metformine	300
d7-metoprolol	300
d6-sotalol	300
d4-sulfamethoxazol	150
d3-trimethoprim	300
d4-diclofenac	500
d1-5-fluorouracil	500
¹³ C, ^{d2} -hydrochloorthiazide	800
d3-ibuprofen	300
d3-naproxen	800
d3-estriol	800
d4-estrone	300

Opm. : Van sommige isotoop gemerkte verbindingen zijn ook varianten beschikbaar.

- 4.8** Stock mengstandaarden van isotoop aangerijkte verbindingen: maak uitgaande van de individuele stockoplossingen van aangerijkte verbindingen (4.7) een mengstandaard die, afh. van de gevoeligheid, de verbindingen bevat in concentraties van 1-10 µg/g, met ACN als verdunningssolvent
- 4.9** Kalibratiestandaarden: maak uitgaande van de stock mengstandaarden van natieve verbindingen (4.6) en de standaardoplossing van isotoop aangerijkte verbindingen (4.8) een reeks verdunningen in ACN met wisselende concentraties aan natieve verbindingen en

constante concentraties aan aangerijkte verbindingen (zie voorbeeld van kalibratiereeks in bijlage A).

4.10 QC standaarden: uitgaande van de stock mengstandaarden (4.6) worden QC standaarden in ACN aangemaakt op één of meer concentratieniveaus.

4.11 Doperingsoplossing van natieve verbindingen: uitgaande van de stock mengstandaarden (4.6) worden voor matrixaddite standaarden in ACN aangemaakt op één of meer concentratieniveaus.

5 MONSTERBEWARING EN -VOORBEHANDELING

Voor de monsterbewaring wordt verwezen naar CMA/1/B.

Voor de monstervoorbehandeling wordt verwezen naar CMA/5/B.8.

Voor de bepaling van het watergehalte en droogrest wordt verwezen naar CMA/2/II/A.1.

6 ANALYSEPROCEDURE

6.1 EXTRACTIE

6.1.1 Cellulose en superabsorbent polymer (SAP)

- Neem 1 g gehomogeniseerd gedroogd materiaal;
- Voeg interne standaard/surrogaat standaard toe, laat 2 u inwerken;
- Voeg 20 ml MeOH toe en soniceer gedurende 1u;
- Neem het supernatans, damp in onder stikstof, neem op in 9:1 water:methanol;
- Neem een testportie voor injectie in de LC-MS/MS.

6.1.2 Plastiek

- Neem 1 g gehomogeniseerd gedroogd materiaal;
- Voeg interne standaard/surrogaat standaard toe en laat 2u inwerken;
- Voeg 10 ml water:MeOH 9:1 toe en soniceer gedurende 1u;
- Neem een testportie voor injectie in de LC-MS/MS.

6.1.3 Slurry of organische fractie

- Neem 1 g gehomogeniseerd gedroogd materiaal (eventueel na indikken, zie CMA/5/B.8);
- Voeg standaard/surrogaat standaard toe en laat 2u inwerken;
- Zuur aan met HCl 0.01M tot pH2; vortex en centrifugeer;
- Neem supernatans en voeg 9 ml water:MeOH 9:1 toe;
- Vortex en neem een testportie voor injectie in de LC-MS/MS (centrifugeer desnoods opnieuw).

6.2 LC-MS/MS ANALYSE

6.2.1 LC-CONDITIES

De UPLC-analyse gebeurt bv. op een UPLC HSS T3 kolom, 1.8 μm , 2.1 x 100 mm, met gradiëntelutie.

Typische UPLC-instellingen zijn hieronder gegeven:

Voor ESI+ verbindingen:

- mobiele fase:
 - A= Water + 0.1% mierzuur + 4 mM ammoniumformaat
 - B= 95:5 ACN:water + 0.1% mierzuur + 4 mM ammoniumformaat
- debiet: 0.3 ml/min
- kolomtemperatuur: 40°C
- injectievolume: 2 μl
- gradiënt:

Tijd	A%	B%
min	%	%
0,00	95	5
7,50	50	50
8,00	10	90
10,00	10	90
10,10	95	5
12.60	95	5

Voor ESI- verbindingen:

- mobiele fase:
 - A= Water + 0.1% azijnzuur
 - B= ACN + 0.1% azijnzuur
- debiet: 0.4 ml/min
- kolomtemperatuur: 40°C
- injectievolume: 5 μl
- gradiënt:

Tijd	A%	B%
min	%	%
0,00	95	5
6,00	10	90
8,00	10	90
8,10	95	5
10,60	95	5

Opm.: De LC-analyse kan ook gebeuren op een HPLC instrument, indien aangetoond kan worden dat de chromatografische resolutie toelaat om de bepaling accuraat uit te voeren.

6.2.2 MS-CONDITIES

Alle opnamen worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd met electrospray ionisatie (ESI).

Typische instellingen voor de MS-acquisitie zijn hieronder voor een Waters Xevo TQ-S gegeven:

ESI+ verbindingen

source temp (°C):	150
capillary voltage (kV):	3
desolvation temp (°C):	400
desolvation gas flow (L/h):	1000
cone gas flow (L/h):	150

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. Deze kunnen verschuiven afhankelijk van de gebruikte kolom.

<i>Component</i>	<i>Type</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Parent mass</i>	<i>Fragment mass</i>	<i>Cone voltage (V)</i>	<i>Collision Energy (V)</i>
metformine	Q	0,89	130	60	25	10
	q		130	71	25	20
d6-metformine	Q	0,88	136	60	25	10
			136	77	25	20
allopurinol	q	1,40	137	54	40	20
	Q		137	110	40	20
d2-allopurinol		1,39	139	59	20	20
	Q		139	112	20	20
gabapentine	q	3,75	172	55	25	25
			172	95	25	25
	Q		172	137	25	15
d4-gabapentine		3,74	176	57	20	20
			176	97	20	20
	Q		176	139	20	15
carbamazepine		8,25	237	165	40	35
	q		237	179	40	35
	Q		237	194	40	20
d2-carbamazepine		8,24	239	181	20	30
	Q		239	196	20	30
sulfamethoxazol	q	6,27	254	92	25	25
			254	108	25	25
	Q		254	156	25	15
d4-sulfamethoxazol		6,26	258	96	25	25
			258	112	25	25
	Q		258	160	25	15
metoprolol	q	5,64	268	72	25	18
			268	98	25	20
	Q		268	116	25	18

Component	Type	RT (min)	Parent mass	Fragment mass	Cone voltage (V)	Collision Energy (V)
d7-metoprolol		5,63	275	79	25	20
			275	105	25	20
	Q		275	123	25	20
sotalol		3,15	273	133	25	25
	q		273	213	25	18
	Q		273	255	25	10
d6-sotalol		3,14	279	134	25	25
			279	214	25	20
	q		279	261	25	10
trimethoprim	q	4,58	291	123	25	25
	Q		291	230	25	22
			291	261	25	25
d3-trimethoprim		4,57	294	123	25	25
	Q		294	230	25	22
			294	264	25	25
claritromycine	q	9,21	748,5	83	40	40
	Q		748,5	158	40	28
			748,5	590	40	20
d3-claritromycine		9,20	751,5	83	20	40
	Q		751,5	161	20	28
			751,5	593	20	20

Q: Transitie voor kwantificatie van de component

q: Transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de identiteit

ESI-verbindingen

source temp (C):	150
capillary voltage (kV):	2
desolvation temp (C):	350
desolvation gas flow (L/h):	1200
cone gas flow (L/h):	150

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. Deze kunnen verschuiven afhankelijk van de gebruikte kolom.

Component	Type	RT (min)	Parent mass	Fragment mass	Cone voltage (V)	Collision Energy (V)
5-fluorouracil	Q	0,93	129	42	30	20
	q		129	86	30	20
d1-fluorouracil	Q	0,92	130	42	30	15
			130	87	30	20
ibuprofen	Q	5,90	205	161	20	10
d3-ibuprofen	Q	5,89	208	164	20	10
naproxen	Q	5,07	229	169	20	30
	q		229	170	20	20

Component	Type	RT (min)	Parent mass	Fragment mass	Cone voltage (V)	Collision Energy (V)
			229	185	20	10
d3-naproxen	Q	5,06	232	169	20	30
			232	170	20	20
			232	188	20	10
estrone		5,32	269	95	20	25
	Q		269	145	20	35
d4-estrone		5,31	273	117	20	20
	Q		273	147	20	35
estriol	q	3,71	287	145	20	35
	Q		287	171	20	35
d3-estriol		3,70	290	147	20	35
	Q		290	173	20	35
diclofenac	q	5,76	294	214	20	25
	Q		294	250	20	15
d4-diclofenac		5,75	298	217	20	20
	Q		298	254	20	10
hydrochloorthiazide	q	2,62	296	205	30	20
	Q		296	269	30	20
13C,d2-		2,61	299	78	30	25
hydrochloorthiazide			299	206	30	20
	Q		299	270	30	20

Ionchromatogrammen bekomen met de bovenstaande instellingen zijn voor de resp. verbindingen opgenomen in Bijlage B en Bijlage C.

6.2.3 IDENTIFICATIE EN INTEGRATIE

De aanwezigheid van natieve verbindingen in de monsters wordt bevestigd op basis van de criteria voor retentietijden en ionenratio's zoals vermeld in CMA/6/D.

De identificatie van de isotoop aangerijkte verbindingen is eveneens gebaseerd op de karakteristieke m/z en de retentietijd.

De geïdentificeerde pieken worden geïntegreerd met behulp van de software van de apparatuur en manueel geverifieerd.

Opmerking:

Indien getwijfeld wordt aan de identiteit van de verbinding, door afwijkende Q/q verhouding of verstoorde chromatogrammen, dan dient een heranalyse te gebeuren met gebruikmaking van verschillende verdunningen (10x, 25x en 50x) of een alternatieve kolom met een verschillend retentiemechanisme conform de werkwijze beschreven in Bijlage D. Indien de werkwijze niet toelaat om de identiteit ondubbelzinnig te bevestigen dan geldt het voordeel van de twijfel en wordt als resultaat "interferentie" gerapporteerd.

6.2.4 KALIBRATIE

De kalibratie omvat de injectie van minstens 5 standaardoplossingen die de te bepalen verbindingen bevatten in oplopende concentraties en de isotoopgemerkte verbindingen in een constante concentratie. Matrixeffecten kunnen grotendeels opgevangen worden met de interne standaardmethode, mits gebruikmaking van een voldoende groot aantal inwendige standaarden, gekozen over het volledige retentietijdsgebied. De meest accurate (maar meest omslachtige) bepaling gebeurt echter met de standaard additie methode: hierbij worden aan het monster of het monsterextract gekende concentraties pesticide toegevoegd waarna op een grafische manier of door berekening de oorspronkelijke concentratie kan bepaald worden.

De kalibratievergelijking heeft een lineair verloop:

$$A_i = aC_i + b \quad (\text{externe standaard methode, standaard additie methode})$$

$$\frac{A_i}{A_{is}} = a \frac{C_i}{C_{is}} + b \quad (\text{interne standaard methode})$$

met

A_i	=	de gemeten piekoppervlakte voor de natieve verbinding i in de standaardoplossing
A_{is}	=	de gemeten piekoppervlakte voor de overeenkomstige inwendige standaard in de standaardoplossing
C_i	=	de concentratie van de natieve verbinding i in ng/g in de standaardoplossing
C_{is}	=	de concentratie van de inwendige standaard i in ng/g in de standaardoplossing

De verhouding van piekoppervlakten van de natieve verbindingen en de overeenkomstige inwendige standaard wordt voor elke te bepalen verbinding uitgezet i.f.v. van de verhouding van de concentraties van beide verbindingen. De coëfficiënten a (helling of relatieve reponsfactor) en b (afgesneden stuk) worden bepaald door lineaire regressie en met 1/X weging.

De correlatiecoëfficiënt dient > 0.995. Het werkgebied wordt bepaald door de concentraties waarvoor de residuele afwijking tot de rechte < 20% bedraagt.

De berekening van de kalibratiecurve gebeurt bij elke analysereeks.

Opmerkingen:

- In geval van de standaard additie methode kan gekozen worden voor een beperkter aantal kalibratiepunten
- In sommige gevallen kan het gebruik van een kwadratische functie meer aangewezen zijn.

7 BEREKENINGEN

Interne standaard methode:

De concentraties in het monster worden vervolgens berekend als volgt:

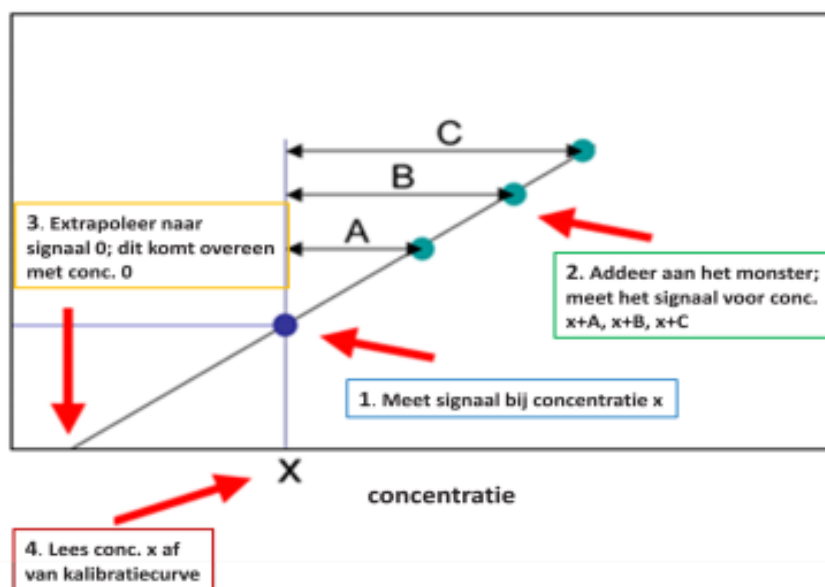
$$C_i(\text{monster}) = \left(\frac{\frac{A_i}{A_{is}} - b}{a} \right) * \frac{g_{is}}{m}$$

met

$C_i(\text{monster})$	=	de concentratie van de native verbinding i in het monster in ng/g ds
A_i	=	de gemeten piekoppervlakte voor de native verbinding i in het monsterextract
A_{is}	=	de gemeten piekoppervlakte voor de overeenkomstige inwendige standaard in het monsterextract
g_{is}	=	de aan het monster toegevoegde hoeveelheid inwendige standaard in ng
a en b	=	de coëfficiënten van de kalibratievergelijking
m	=	de ingenomen hoeveelheid monster in g ds

Standaard additie methode:

Het oorspronkelijke gehalte in het eindextract kan grafisch bepaald worden of berekend worden als het geëxtrapolerde stuk op de X-as van het diagram van de oppervlakte i.f.v. de geaddeerde concentratie zoals aangegeven in de onderstaande figuur:



Opmerkingen:

- Bij overschrijding van de bovenste grens van het werkgebied dient voor de bepaling van de betrokken verbinding het extract verdund te worden met mobiele fase en opnieuw gemeten.

8 KWALITEITSCONTROLE

8.1 INSTRUMENTELE DETECTIELIMIET (IDL)

De instrumentele detectielimiet is een maat voor de gevoeligheid van het apparaat. Aan de hand van het chromatogram van de laagste kalibratie-oplossing wordt voor elke verbinding de kleinst meetbare concentratie bepaald, gedefinieerd als:

$$IDL = 3 * RG * conc / PH$$

met

IDL	=	de instrumentele detectielimiet in ng/g
RG	=	de "peak-to-peak" ruishoogte aan de voet van de chromatogrampiek van de verbinding
PH	=	de piekhoogte van de verbinding
C	=	concentratie van de verbinding in de kalibratie-oplossing in ng/g

De aldus bekomen DL(instr) mogen niet groter zijn dan de minimale waarden noodzakelijk voor het bekomen van de gevraagde rapporteergrenzen.

8.2 PROCEDUREBLANCO

Bij elke analysereeks wordt een blanco staal (d.i. zonder monsterinname) met de bovenstaande procedure opgewerkt en gemeten. M.b.t. de blancobijdrage worden volgende regels gehanteerd:

- Voor monsterwaarden groter dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan 10%;
- Voor monsterwaarden kleiner dan 5 maal de rapporteergrens: de chromatogrammen dienen vrij te zijn van pieken in een concentratie groter dan de helft van de rapporteergrens.

8.3 CONTROLE VAN DE GELDIGHEID VAN DE KALIBRATIEVERGELIJKING

Vlak na de kalibratiestandaarden, op het einde van de meetreeks en om de 12 injecties worden de QC meetstandaarden geïnjecteerd en de concentraties worden bepaald a.d.h.v. de kalibratievergelijking. De berekende concentraties worden genoteerd in de respectievelijke controlekaarten van de QC standaarden en moeten binnen de aangegeven grenzen vallen.

8.4 TERUGVINDING VAN DE ISOTOOPGEMERKTE VERBINDINGEN

Voor elk monster wordt de terugvinding van isotoopgemerkte inwendige standaarden of van de surrogaatverbindingen bepaald, d.i. de experimenteel teruggevonden hoeveelheid van elk van de bij het begin van de analyse toegevoegde standaarden. Dit gebeurt door vergelijking van de oppervlakte van de isotoop aangerijkte verbinding bekomen voor het monster ($A_{is}(\text{monster})$) t.o.v. de gemiddelde oppervlakte bekomen voor kalibratiestandaarden ($A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$). De terugvinding wordt gegeven door:

$$R\% = A_{is}(\text{monster}) * 100 / A_{is}(\text{kalibratiestandaard})$$

Het terugvindingsrendement is afhankelijk van extractie/clean up rendement, sorptiefenomenen en signaalsuppressie/versterking door matrixbestanddelen. Voor de kwantificering dient het

terugvindingsrendement van de isotoopgemerkte verbindingen minimaal 20 % en maximaal 150% te bedragen. Indien desgevallend (bv. indien geen monster meer beschikbaar is of indien heranalyse niet relevant is i.f.v. gebruik van het resultaat ...) toch resultaten worden gerapporteerd waarbij aan het criterium voor terugvinding niet voldaan is, dient dit als opmerking op het verslag vermeld te worden.

Opm.:

- Bij ernstige signaalonderdrukking kan het helpen om het extract opnieuw te analyseren na verdunning (10x, 25x en 50x) op ofwel dient een heranalyse te gebeuren met gebruikmaking van een andere kolom met een verschillend retentiemechanisme conform de werkwijze beschreven in Bijlage D. Indien de werkwijze niet toelaat om de verbinding verantwoord te kwantificeren dan geldt het voordeel van de twijfel en wordt als resultaat "interferentie" gerapporteerd.

8.5 CONTROLEMONSTER EN MATRIXADDITIE

In elke analysereeks wordt een controlemonster meegenomen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van blanco monster (cellulose, SAP, plastic) gedopeerd met verbindingen in een concentratie relevant voor het beoogde toepassingsgebied. De gemeten concentraties worden vergeleken met de additiewaarden. Alternatief kan men aan een gekozen monster van de meetreeks een additie uitvoeren en hiervoor de terugvindingen bepalen. De terugvindingen worden genoteerd op de respectievelijke controlekaart van het controlemonster en dienen gelegen te zijn tussen de controlegrenzen van deze kaarten.

9 PRESTATIEKENMERKEN

Voor de prestatiekenmerken wordt verwezen naar CMA deel 6.

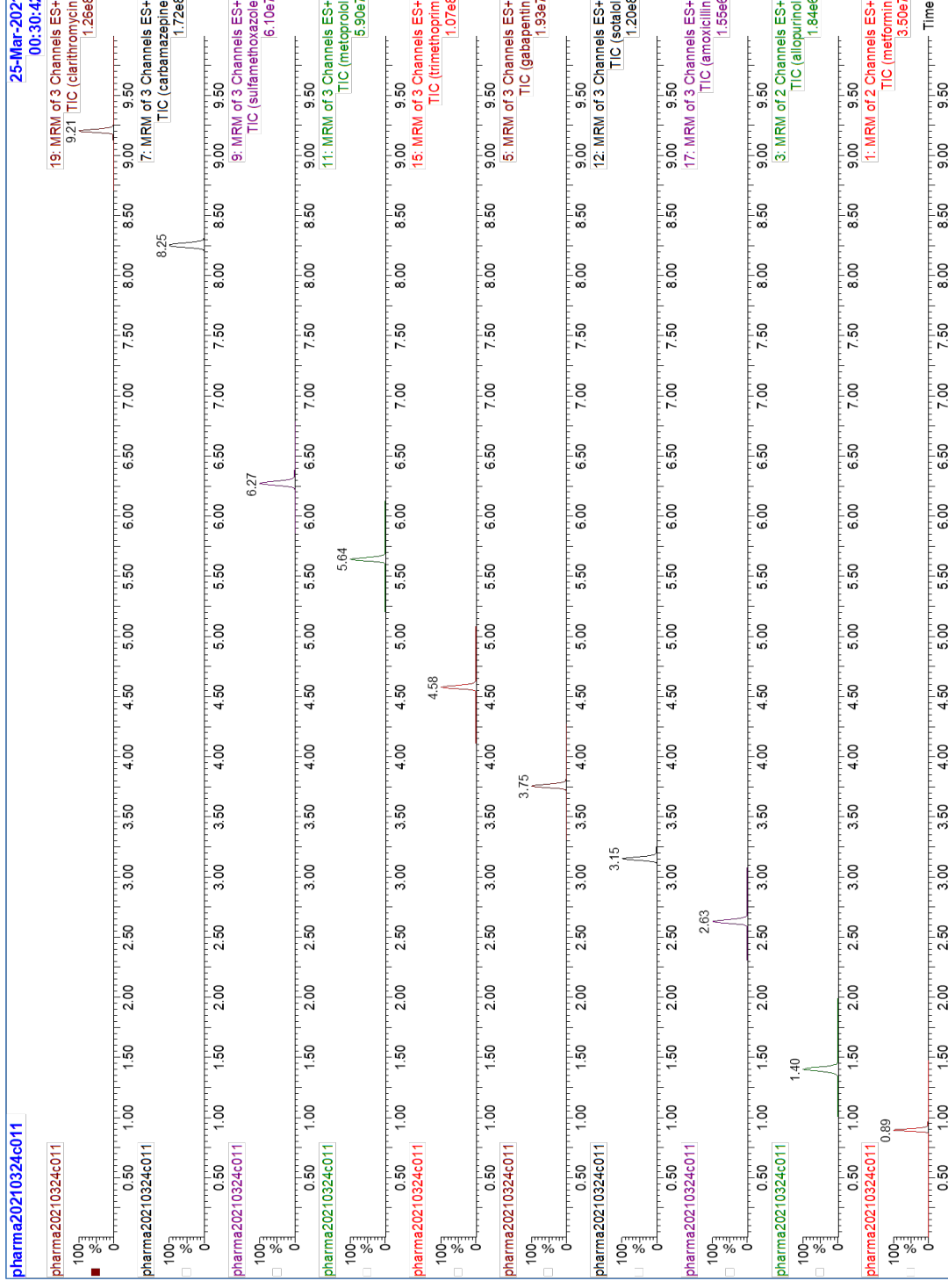
10 REFERENTIES

BIJLAGE A: Voorbeeld van kalibratie-oplossingen in ng/mL*ESI+ verbindingen*

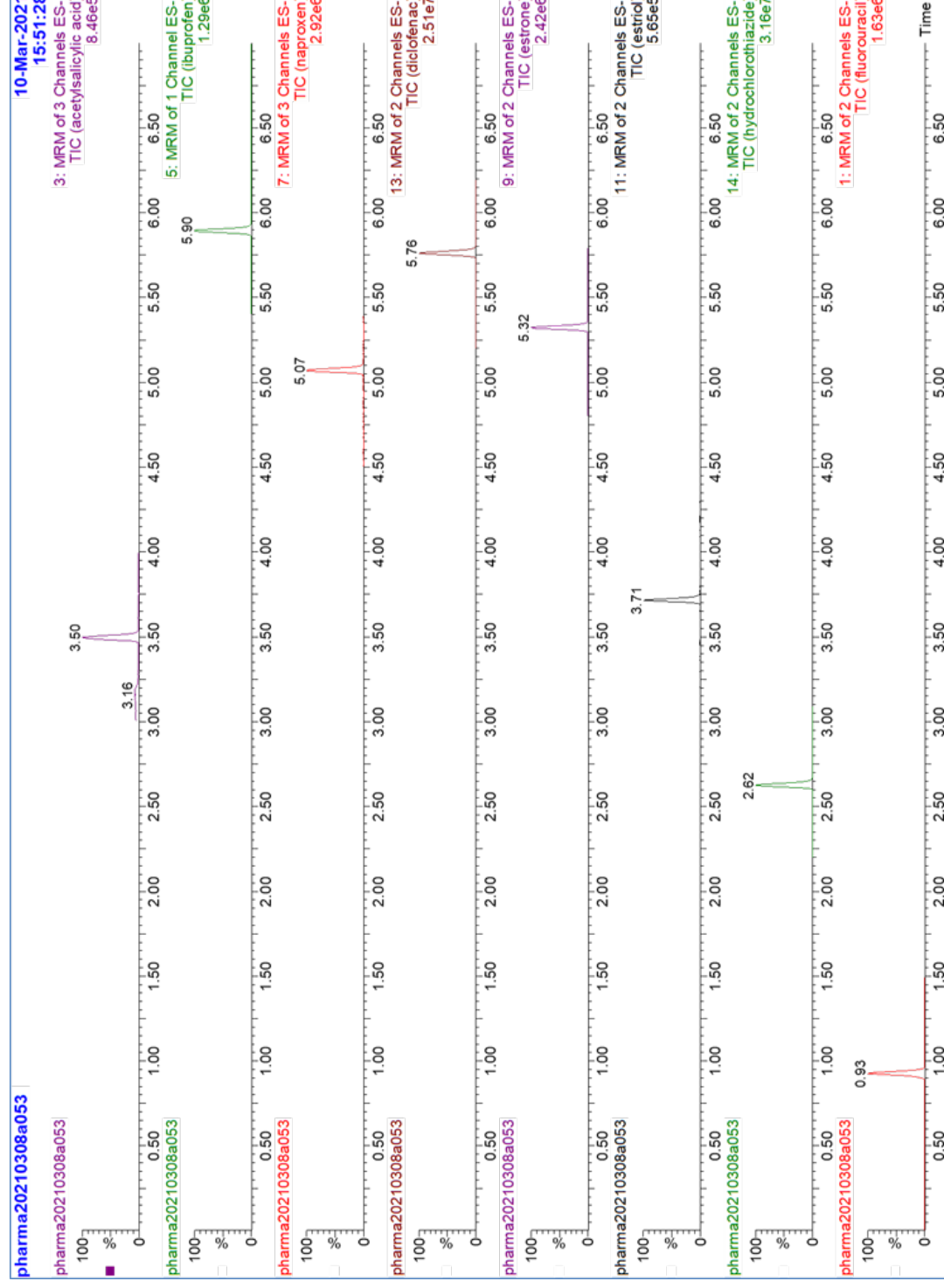
	allopurinol	carbamazepine	claritromycine	gabapentine	metformine	metoprolol	sotalol	sulfamethoxazol	trimethoprim
CAL 8	0,152	0,155	0,177	0,159	0,137	0,159	0,145	0,167	0,147
CAL 7	0,304	0,309	0,353	0,317	0,274	0,318	0,290	0,334	0,294
CAL 6	0,507	0,515	0,589	0,529	0,457	0,530	0,483	0,557	0,489
CAL 5	1,01	1,03	1,18	1,06	0,91	1,06	0,97	1,11	0,98
CAL 4	3,04	3,09	3,53	3,17	2,74	3,18	2,90	3,34	2,94
CAL 3	9,22	9,37	10,70	9,62	8,31	9,63	8,79	10,1	8,9
CAL 2	25,8	26,2	30,0	26,9	23,3	27,0	24,6	28,3	24,9
CAL 1	55,3	56,2	64,2	57,7	49,9	57,8	52,7	60,7	53,4
IS	21,4	4,05	3,92	8,08	3,67	4,25	4,05	3,93	4,45

ESI- verbindingen

	diclofenac	estriol	estrone	5-fluorouracil	hydrochlorothiazide	ibuprofen	naproxen
CAL 8	0,514	0,513	0,561	0,574	0,528	0,567	0,516
CAL 7	0,925	0,923	1,01	1,03	0,951	1,021	0,928
CAL 6	1,44	1,44	1,57	1,61	1,48	1,59	1,44
CAL 5	3,29	3,28	3,59	3,68	3,38	3,63	3,30
CAL 4	9,34	9,33	10,2	10,4	9,60	10,31	9,37
CAL 3	24,3	24,2	26,5	27,1	25,0	26,8	24,4
CAL 2	46,7	46,6	51,0	52,2	48,0	51,6	46,9
CAL 1	115	115	126	129	119	127	116
IS	9,54	27,0	7,59	19,3	1,45	16,0	18,7

BIJLAGE B: UPLC-(ESI+)MS/MS chromatogrammen voor een kalibratie-oplossing van pharmaceuticala

BIJLAGE C: UPLC-(ESI-)MS/MS chromatogrammen voor een kalibratie-oplossing van pharmaceuticala



BIJLAGE D: Alternatieve LC-MS/MS analysemethode bij matrix-interferenties voor de polaire positieve componenten (allopurinol en metformine)**LC-condities**

De UPLC-analyse gebeurt bv. op een Atlantis T3, 3.0 μm , 4.6 x 100 mm, met gradiëntelutie. De kolom geeft voldoende retentie voor de meest polaire positieve verbindingen (allopurinol en metformine).

Typische UPLC-instellingen zijn hieronder gegeven:

Voor ESI+ verbindingen:

- mobiele fase:
 - A= Water + 0.3% mierenzuur
 - B= 50:30:20 ACN:MeOH:water + 0.3% mierenzuur
- debiet: 0.5 ml/min
- kolomtemperatuur: 30°C
- injectievolume: 2 μl
- gradiënt:

Tijd	A%	B%
Min	%	%
0	95	5
5	95	5
18	1	99
20	1	99
20.5	95	5
25	95	5

Opm.: De LC-analyse kan ook gebeuren op een HPLC instrument, indien aangetoond kan worden dat de chromatografische resolutie toelaat om de bepaling accuraat uit te voeren.

MS-condities

Alle opnamen worden met Multiple Reaction Monitoring (MRM) uitgevoerd met electrospray ionisatie (ESI).

Typische instellingen voor de MS-acquisitie zijn hieronder voor een Waters Xevo TQ-S gegeven:

ESI+ verbindingen

source temp (°C):	150
capillary voltage (kV):	3
desolvation temp (°C):	400
desolvation gas flow (L/h):	1000
cone gas flow (L/h):	150

De onderstaande ionentransities worden geregistreerd. Tegelijk zijn typische UPLC retentietijden aangegeven. Deze kunnen verschuiven afhankelijk van de gebruikte kolom.

component	type	RT (min)	Parent mass	Fragment mass	Cone voltage (V)	Collision Energy (V)
metformine	Q	1.99	130	60	25	10
	q		130	71	25	20
d6-metformine	Q		136	60	25	10
			136	77	25	20
allopurinol	q	6.73	137	54	40	20
	Q		137	110	40	20
d2-allopurinol	Q		139	59	20	20
			139	112	20	20
gabapentine	q	11.33	172	55	25	25
	Q		172	95	25	25
			172	137	25	15
d4-gabapentine	Q		176	57	20	20
			176	97	20	20
			176	139	20	15
carbamazepine	q	18.04	237	165	40	35
	Q		237	179	40	35
			237	194	40	20
d2-carbamazepine	Q		239	181	20	30
			239	196	20	30
Sulfamethoxazol	q	15.11	254	92	25	25
	Q		254	108	25	25
			254	156	25	15
d4-sulfamethoxazol	Q		258	96	25	25
			258	112	25	25
			258	160	25	15
metoprolol	q	13.20	268	72	25	18
	Q		268	98	25	20
			268	116	25	18
d7-metoprolol	Q		275	79	25	20
			275	105	25	20
			275	123	25	20
sotalol	q	10.29	273	133	20	25
	Q		273	213	20	18
			273	255	20	10
d6-sotalol	q		279	134	20	25
			279	214	20	20
			279	261	20	10
trimethoprim	q	11.97	291	123	25	25
	Q		291	230	25	22
			291	261	25	25
d3-trimethoprim	Q		294	123	25	25
			294	230	25	22

<i>component</i>	<i>type</i>	<i>RT (min)</i>	<i>Parent mass</i>	<i>Fragment mass</i>	<i>Cone voltage (V)</i>	<i>Collision Energy (V)</i>
			370	212	20	10
claritromycine	q	16.98	748.5	83	40	40
	Q		748.5	158	40	28
			748.5	590	40	20
d3-claritromycine	Q		751.5	83	20	40
			751.5	161	20	28
			751.5	593	20	20

Q: *Transitie voor kwantificatie van de component*

q: *Transitie ter bevestiging (kwalificatie) van de identiteit*

Ionchromatogrammen bekomen met de bovenstaande instellingen zijn voor de resp. verbindingen zijn opgenomen in onderstaande figuur.

UPLC-(ESI+)MS/MS chromatogrammen voor een kalibratie-oplossing van pharmaceutica

