

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

 PROMOCIJAS DARBS

**VETERINĀRO PREPARĀTU ATLIEKU NOTEIKŠANA
AR MASSPEKTROMETRIJAS METODĒM**

Vadīms Bartkevičs

Zinātniskais vadītājs
Dr.ķīm., doc. J.Ģībietis

RĪGA
2004

ABSTRACT

Analysis of veterinary drugs residues using massspectrometric methods. Bartkevičs V., supervisors Dr.chem.J.Ģībietis, Dissertation. 65 pages, bibliography 55 citations. In Latvian.

VETERINARY DRUGS, GAS CHROMATOGRAPHY, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY, LEVAMIZOLE, STEROID SUBSTANCES, ANTIBIOTICS, NSAID GROUP COMPOUNDS.

This dissertation is dealing with determination of veterinary drug residues using massspectrometric methods. Survey of publications dealing with analysis of levamisole, non-steroid anti-inflammatory drugs, steroid compounds and sulphonamides was performed. Massspectrometric methods for determination of residues of 33 different compounds are elaborated. Mass spectra of veterinary drugs in different ionisation modes (EI, PCI, NCI, electrospray) are given and possible fragmentation patterns are described. Optimisation of analytical methods for detection of veterinary drug residues is performed. Account was made on achieving highest sensitivity level of analysis and possibilities to apply elaborated methods for determination of wide range of compounds. Main characteristics of GC-MS and LC-MS-MS methods (linearity, reproducibility and recovery) have been checked. Elaborated methods have been applied for residue testing of Latvian animal origin products. Results show low level of occurrence of veterinary drug residues.

РЕФЕРАТ

Определение остаточных количеств ветеринарных препаратов методами масспектрометрии. В.Барткевич. Научный руководитель др.хим.Я.Гибиетис, Диссертация. 65 страниц, 55 литературных ссылок. На латышском языке.

ОСТАТКИ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ГАЗОВАЯ И ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ - МАССПЕКТРОМЕТРИЯ, ЛЕВАМИЗОЛ, ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, АНТИБИОТИКИ, НЕСТЕРОИДНЫЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА

Диссертация посвящена разработке методов определения остаточных количеств ветеринарных препаратов методами масспектрометрии. Проведён обзор публикаций, посвящённых определению остатков левамизола, гормональных препаратов, нестероидных противовоспалительных лекарств и сульфаниламидов в различных матрицах. Разработаны хромато-масс-спектрометрические методы для определения остатков 33 различных препаратов. Сняты и обсуждены масспектры ветеринарных препаратов с различными методами ионизации. Предложена возможная схема фрагментации исследуемых веществ. Проведена оптимизация основных параметров метода для определения остатков ветеринарных веществ. Основное внимание уделено достижению высокой чувствительности метода и возможности использования метода для анализа по возможности большего числа препаратов. Проверены основные аналитические характеристики масспектрометрических методов. Разработанные методы использованы для контроля в Латвии остатков ветеринарных веществ в продуктах животного происхождения.

PROMOCIJAS DARBĀ LIETOTO SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

EJ	Elektronu triecienu jonizācija
ES+	Pozitīvā elektriskās izsmidzināšanas jonizācija
GH	Gāzu hromatogrāfija
GH-MS	Gāzu hromatogrāfija - masspektrometrija
AEŠH	Šķidrums hromatogrāfija
AEŠH-MS-MS	Šķidrums hromatogrāfija - tandēma (ar trīskāršo kvadropolu) masspektrometrija
NĶJ	Negatīvā ķīmiskā jonizācija
PĶJ	Pozitīva ķīmiskā jonizācija
SIM	Izvēlēto jonu monitorings
MRM	Izvēlēto reakciju monitorings
TQ	Trīskārša kvadropola masas analizators

SATURS

Referāti	2
Ievads	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Veterinārie preparāti un to noteikšanas metodes	9
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	20
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒŠANA	32
3.1. Levamizola atlieku noteikšanas metode	32
3.2. Hormonālo savienojumu atlieku noteikšanas metode	43
3.3. Sulfanilamīdu un nitroimidazolu atlieku noteikšanas metode	48
3.4. Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu atlieku noteikšanas metode	52
3.5. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas izmantošana veterināro preparātu atlieku noteikšanai	57
SECINĀJUMI	60
LITERATŪRAS SARAKSTS	61
PIELIKUMI	
PUBLIKĀCIJU KOPIJAS	

IEVADS

Problēmas aktualitāte

Mūsdienu lauksaimniecībā ražošanas efektivitātes paaugstināšanai plaši tiek lietoti dažādi veterinārie preparāti - dažādu slimību ārstēšanai, dzīvnieku svara pieauguma uzlabošanai, nomierināšanai transportēšanas laikā utt. Sakarā ar veterināro zāļu izmantošanu, to atliekas tiek atrastas arī dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos un var izsaukt negatīvas reakcijas cilvēka organismā. Pēdējos gados ir novērojama pastiprināta sabiedrības interese par pārtikas nekaitīgumu, tāpēc ir nepieciešams kontrolēt zāļu atlieku koncentrāciju tādos pārtikas produktos kā piens, gaļa, gaļas izstrādājumi, zivis. Veterināro zāļu atlieku kontroles nepieciešamība ir noteikta vairākos Eiropas Savienības un Latvijas likumdošanas aktos.

Viens no svarīgākajiem kontroles efektivitātes priekšnosacījumiem ir **precīzu, ātru un jutīgu analīzes metožu izmantošana**. Līdzās veterināro zāļu atlieku noteikšanas metodēm ir nepieciešami arī farmakokinētiskie pētījumi, medikamentu metabolisma noteikšana un veterināro preparātu tīrības pārbaude. Pēdējos gados ir novērojama strauja attīstība masspektrometrijas analīžu jomā. To nosaka iespēja veikt analīzes ar lielāku jutību un vienlaicīgi iegūt informāciju par vielas struktūru, tādējādi apstiprinot preparāta klātbūtni paraugā. Ņemot vērā masspektrometrisko metožu selektivitāti, ir iespējams **vienkāršot paraugu sagatavošanu**, jo nav nepieciešama daudzu traucējošo vielu atdalīšana. Vēl viena masspektrometrijas analīžu metožu priekšrocība ir iespēja pielietot tās plašam ķīmisko savienojumu spektram. Līdz ar to ir iespējams izstrādāt metodes, kas **vienlaicīgi ļauj noteikt vairākus savienojumus**.

Promocijas darba mērķis

Promocijas darba mērķis ir jaunu analītisko metožu izstrāde veterināro zāļu atlieku analīzēm, kam, salīdzinājumā ar literatūrā aprakstītām metodēm, būtu vairākas priekšrocības:

- zemāka noteikšanas robeža;
- vienkāršāka paraugu sagatavošanas procedūra;
- iespēja izmantot metodi pēc iespējas vairāku veterināro zāļu atlieku noteikšanai;
- būtu iespējams izmantot izstrādātās metodes savienojumu klātbūtnes pierādīšanai atbilstoši oficiālām prasībām.

Ņemot vērā veterināro preparātu zemo koncentrāciju un nepieciešamību pēc vielas identificēšanas, tika izvēlēta gāzu hromatogrāfijas - masspektrometrijas (GH-MS) un šķidrums hromatogrāfijas - trīskārša kvadrupola masspektrometrijas (AEŠH-MS-MS)

metodes. Lai palielinātu analīzes jutību un uzlabotu selektivitāti, pētījumos ir pielietota gāzu hromatogrāfija - masspektrometrija ar pozitīvo un negatīvo ķīmisko jonizāciju.

Zinātniskā novitāte un pētījumu praktiskā nozīme

Šajā darbā ir piedāvāti vairāki jauninājumi, kas iepriekš netika aprakstīti zinātniskajā literatūrā:

- 1) pirmo reizi aprakstīta levamizola noteikšanas metode ar gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodi pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā un šķidrums hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju elektroizsmidzināšanas režīmā [1];
- 2) pirmo reizi piedāvāta hormonālo savienojumu noteikšanas metode, kas, izmantojot **unificētu paraugu sagatavošanas shēmu**, var **vienlaicīgi** noteikt stilbēnu, steroīdu un rezorcinskābes laktonu atliekas dzīvnieku izcelsmes produkcijā [2];
- 3) pirmo reizi izstrādāta gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu (fenilbutazols, ketoprofēns, naproksens, fenoprofēns un diklofenaks) atlieku noteikšanai gaļā [3,4];
- 4) pirmo reizi izstrādāta šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metode, kas ļauj **vienlaicīgi** noteikt trimetoprimu, sulfanilamīdu un nitroimidazolu grupas preparātus [5];
- 5) veterināro preparātu atlieku noteikšanai pielietotās shēmas ir izmantotas fentanila farmakokinētikas pētījumiem [6];
- 6) pirmo reizi gelfiltrācijas hromatogrāfija tika izmantota unificētai paraugu sagatavošanai levamizola, fenilbutazona, steroīdu un sulfanilamīdu atlieku noteikšanas analīzē.

Kopumā šajā darbā ir izstrādātas metodes 33 savienojumu noteikšanai. Tie pārstāv dažādas veterināro savienojumu grupas: antibiotikas, pretparazītos preparātus, augšanas stimulatorus, nesteroīdos pretiekaisuma līdzekļus.

Izstrādājot metodes, lielākā vērība tika pievērsta metožu jutībai un vielu identificēšanas iespējai. Tika pārbaudīta arī citi metožu parametri - precizitāte, linearitāte, atgūstamība. Tika piedāvātas savienojumu fragmentācijas shēmas un noteiktas arī masspektra raksturīgo m/z līniju attiecības, kas ir svarīgs rādītājs vielas identitātes apstiprināšanai.

Promocijas darba aprobācija

Izstrādātas metodes tika izmantotas Valsts veterināro zāļu atlieku uzraudzības programmas ietvaros. Līdz ar to promocijas darba laikā tika iegūta plaša informācija par dzīvnieku izcelsmes produktu nekaitīgumu un veterināro preparātu klātbūtni Latvijas produktos.

Darbs tika izstrādāts Valsts Veterinārmedicīnas diagnostikas centra Pārtikas kontroles laboratorijā un Latvijas Universitātes Ķīmijas fakultātes Analītiskās ķīmijas katedrā. Darba rezultāti tika izklāstīti piecās publikācijās [1-3, 5, 6] un ziņoti divās zinātniskās konferencēs (II Pasaules latviešu zinātnieku kongresā un *Euroresidue V* konferencē).

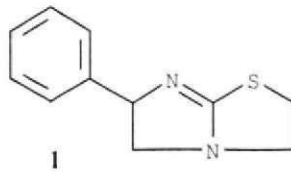
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Veterinārie preparāti un to noteikšanas metodes

Ņemot vērā veterināro preparātu daudzveidību (pašlaik Latvijā ir noteikti ierobežojumi vairāk kā 200 zāļu lietošanai veterinārmedicīnā), to atlieku noteikšanas metožu izstrādei ir izvēlēti savienojumi ar atšķirīgām ķīmiskām īpašībām, kas pārstāv dažādas preparātu grupas. Levamizola molekulai piemīt bāziskās īpašības un tas pārstāv antihelmintu preparātu grupu. Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu molekulām piemīt organisko skābju īpašības. Savukārt sulfanilamīdi uzrāda amfotēras īpašības un tie pārstāv antimikrobiālo preparātu grupu. Izstrādājot noteikšanas metodes citiem savienojumiem, ir iespējams izmantot šajā darbā piedāvātas shēmas, vadoties no preparāta ķīmiskām īpašībām.

1.1.1. Levamizols un to atlieku noteikšanas metodes

Veterinārajā medicīnā plaši tiek lietoti antihelmintu preparāti. Pārsvārā šīm vielām ir raksturīga selektīva iedarbība pret helmintiem un nosacīti tās var iedalīt antitrematožu, antinematozu vai anticistožu preparātos. Visplašāk veterinārijā pielieto imidazolu atvasinājumu grupas preparātus. Raksturīgākais šīs grupas pārstāvis ir levamizols **1** [7, 8, 9].



Levamizols ir labi ūdenī šķīstošs savienojums, kuru lieto ne tikai orāli, bet arī injekciju veidā intramuskulāri. To izmanto nematožu apkarošanai liellopiem, aitām, kazām, cūkām, suņiem, kaķiem un vistām.

Levamizola iedarbības mehānisms pamatojas uz tiešu holinērgisku iedarbību. Lielās devās iedarbība pastiprinās, jo tiek inhibēta acetilholīnesterāze. Parazītiem tiek novērota spazmatiska paralīze. Saimnieka organismā levamizols izsauc blakusparādības, kas ir līdzīgas nikotīna iedarbībai, līdz pat neiromuskulārai blokādei. Novērots, ka levamizolam piemīt imunostimulējoša iedarbība.

Levamizolam piemīt plaša spektra antihelmintā iedarbība. Novērots, ka vielai ir raksturīgas ierobežotas spējas cīņā pret parazītu kāpuru stadijām. Dažiem helmintu veidiem ir novērota paaugstināta izturība pret šo preparātu. Dozācija: injicējot intravenozi vai zem ādas - 5 mg/kg, orāli - 7,5 mg/kg, zāļu uzlējuma formā - 10 mg/kg.

Levamisolam, atšķirībā no benzimidazola rindas savienojumiem, ir raksturīga ātra antiparazītāra iedarbība. Iedarbības maksimums ir novērots dažas stundas pēc preparāta ievadīšanas. Iedarbības intensitāte ir apgriezti proporcionāla laikam. Levamizola iedarbība ir samērā neilga. Pēc tam levamisols metabolizējas un izvadās no organisma. Pēc 24 stundām 90% no ievadītās preparāta devas pāriet urīnā. Puspārvēršanās laiks ir 4 stundas. Suņiem smagas saindēšanās pazīmes novērotas pēc 12 mg/kg levamizolas ievadīšanas. Letālā deva atkarībā no organisma stāvokļa ir 45-80 mg/kg ķermeņa svara. Blakusparādības ir līdzīgas intoksikācijām ar nikotīnu: nemiers, muskuļu tremors, caureja, atmiņas zudumi.

Pēc levamizola ievadīšanas ir nepieciešams 3 dienu intervāls pirms var lietot dzīvnieka pienu un 8 dienas - gaļu. ASV ir aizliegts lietot levamizolu govīm laktācijas periodā [10]. Eiropas Savienības valstīs ir uzstādīta maksimāli pieļaujamā norma levamizola saturam dzīvnieku izcelsmes pārtikas produkcijā 100 µg/kg [11].

Pastāv vairākas metodes levamizola noteikšanai dažādās matricās. Levamizola tīrību veterinārajās zālēs iespējams noteikt ar titrēšanu vai ar plānslāņa hromatogrāfiju [12, 13, 14]. Veterināro zāļu kvalitātes kontrolei pielieto arī spektrofotometrijas metodes [15]. Šīs metodes pielieto, ja levamizola koncentrācija ir liela un ir ļoti maz traucējošo vielu.

Levamizola analīzēm sarežģītās matricās izmanto hromatogrāfiskās metodes vai polarogrāfiju. Pirms noteikšanas ar gāzu vai šķidrums hromatogrāfiju paraugu nepieciešams attīrīt no traucējošām vielām. Parauga sagatavošanai galvenokārt izmanto ekstrakciju ar etilacetātu vai hloroformu sārmainā šķīdumā. Ekstrakta attīrīšanai lieto:

- *šķidrums - šķidrums ekstrakciju* [11, 16, 17]. Šī attīrīšanas metode pamatojas uz levamizola ķīmiskajām īpašībām. Skābā vidē levamisols protonējas un viegli šķīst ūdenī. Sārmainos šķīdumos levamisols atrodas molekulārā formā un šķīdība ir lielāka organiskos šķīdinātājos. Izmantojot pH izmaiņas un vielu dažādo šķīdību, ir iespējams iegūt ļoti tīru ekstraktu tālākai analīzei. Metodes trūkums ir liela darbietilpība un liels reagentu patēriņš.
- *cietās fāzes ekstrakciju ar C18 kolonnas* [18]. Levamizolu ekstrahē C18 kolonnās no sārmaina šķīduma (pH=11,0-11,2). Eluē ar etilacetātu, kas piesātināts ar ūdeni. Metode ir ātra un ļauj efektīvi atdalīt traucējošās vielas.
- *šķidrums hromatogrāfiju* [19]. Ātra un efektīva metode, kas var tikt automatizēta. Nepieciešamība izmantot šķidrums hromatogrāfu gan parauga sagatavošanai, gan analīzei palielina analīzes izmaksas un sarežģītību.

Pēc ekstrakta attīrīšanas levamizola noteikšanai visbiežāk izmanto šķidrums hromatogrāfiju [10], gāzu hromatogrāfiju ar slāpekļa - fosfora detektoru [17, 18], gāzu hromatogrāfiju ar masspektrometrisko detektoru [11].

Šķidrums hromatogrāfiju pārsvarā veic ar C18 vai C8 kolonnu, par kustīgo fāzi izmantojot CH₃OH/H₂O/CH₃COOH maisījumu (30/69/1 tilpuma procenti), vai CH₃CN /0,1M (NH₄)₂CO₃ (65/35) maisījumu [19]. Izmanto arī jonu pāru šķidrums hromatogrāfiju. Šajā gadījumā pielieto kustīgo fāzi ar sekojošu sastāvu: 0,2% etiķskābes šķīdums ūdenī - metanols - heptānsulfonskābe (55:45:2) [20]. Analizējot levamizola saturu pienā ar *Extrelut* kolonnas ekstrakciju un šķidrums hromatogrāfiju, minimālā nosakāmā levamizola koncentrācija ir 20-50 µg/l [10]. Gāzu hromatogrāfijai izmanto nepolāras kolonnas DB1 vai DB5 un nesējgāzi hēliju. Izmantojot termojonu detektoru, var panākt jutību 5 µg levamizola / kg parauga. [21]. Literatūrā ir dati par minimālo nosakāmo levamizola koncentrāciju 1 µg / L piena [17]. Bet šāda augsta jutība panākta ar lielu iesvaru un ilgstošu, darbietilpīgu parauga attīrīšanu. Darba autori izmantoja četras pārejas starp organiskiem šķīdinātājiem un ūdens fāzi. Metode prasa lielus reaģentu daudzumus (vienam paraugam - 300 ml etilacetāta, 200 ml cikloheksāna un 100 ml dihlormetāna), kas palielina metodes izmaksas. Bez tam, sakarā ar sarežģītu parauga sagatavošanas procedūru, palielinās arī levamizola zudumu vai piesārņojuma iespējas.

Literatūrā aprakstīta levamizola noteikšanas metode ar superkritisko šķidrums hromatogrāfiju - masspektrometriju [22]. Šajā metodē par eluentu izmanto šķīdru CO₂ ar metanola vai izopropanola piedevām. Levamizola analīze uz skābām nekustīgām fāzēm (-CN, ODS2) nav iespējama, jo ir novērojama preparāta absorbcija uz tām. Darbam izmanto kolonnas pildījumus ar -NH₂ grupām. Šādā sistēmā var sadalīt četrus veterinārus preparātus - levamizolu, linkomicīnu, hloramfenikolu un furazolidonu. Detektora izvēli ietekmē tas, ka linkomicīna un furazolidona hromoforām grupām ir zema gaismas absorbcija. Tāpēc UV detektora vietā ir nepieciešams izmantot masspektrometrisko detektoru. Darbā ir izmantotas veterināro preparātu standartvielas un publikācijā nav apskatīta levamizola ekstrakcijas un ekstrakta attīrīšanas procedūras. Tāpēc ir grūti spriest par šīs metodes izmantošanas iespējām levamizola analīzēm dzīvnieku izcelsmes produktos. Publikācijā nav sniegta informācija par metodes atkārtojamību un jutību. Literatūrā tika piedāvāta arī šķidrums hromatogrāfija – masspektrometrijas metode atmosfēras spiediena ķīmiskās jonizācijas režīmā [16]. Metodes noteikšanas robeža ir 2 – 4 µg/kg.

Apskatītajā zinātniskajā literatūrā nav piedāvāta gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā un šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metode elektroizsmidzināšanas režīmā, kas spēj būtiski uzlabot noteikšanas robežu. Tāpat nav aprakstīta iespēja paraugu sagatavošanai pielietot gelfiltrācijas hromatogrāfiju, kas ļauj vienkāršot un unificēt paraugu sagatavošanas procedūras.

1.1.2. Sulfanilamīdu un nitroimidazolu grupas preparāti un to noteikšanas metodes

Sulfanilamīdu preparāti ir daudzi organiskie savienojumi, kuriem piemīt ārstnieciskas īpašības. Sulfanilamīdi ir baltas vai viegli krāsainas kristāliskas vielas, dažkārt ar rūgtu garšu, ar dažādām kušanas temperatūrām. Daudzi savienojumi grūti šķīst ūdenī, bet vieglāk organiskos šķīdinātājos (acetons, spirti). Sulfanilamīdiem ir raksturīgas amfotēras īpašības. Aromātiskai NH_2 grupai piemīt bāzisks raksturs un ar minerālskābēm tā veido ūdenī šķīstošus sāļus.

Sulfanilamīdus izmanto humānajā medicīnā, kā antibakteriālus līdzekļus ar ķīmiski – terapeitisku efektu [22]. Preparātus pielieto pneimonijas, angīnas, meningītu, rozes, zarnu infekciju saslimšanas gadījumos. Sulfanilamīdu terapeitisko efektivitāti 1932.gadā atklāja G.Domaks. Tagad sintezēti un izpētīti vairāk kā 6000 preparāti no šīs grupas, bet medicīniskā praksē izmanto aptuveni 20 preparātus. Sulfanilamīdus bieži izmanto kā piedevas dzīvnieku barībai. Veterinārmedicīnā sulfanilamīdus izmanto zarnu infekciju un citu slimību ārstēšanai. Sulfanilamīdu atliekas var nokļūt pārtikā ar dzīvnieku izcelsmes produktiem (gaļa, piens) un apdraudēt cilvēku veselību. Īpaši bīstams ir sulfadimidīns, jo tam piemīt kancerogēna iedarbība. Pēc sulfanilamīdu izmantošanas dzīvnieku ārstēšanai šie preparāti un to metabolīti koncentrējas galvenokārt aknās un nierēs. Muskuļaudos un urīnā šo vielu koncentrācija ir zemāka.

Saskaņā ar Ministru kabineta noteikumiem Nr.149 (01.04.2003.), visu sulfanilamīdu grupas savienojumu kopējais atlieku daudzums produktīvo dzīvnieku audos (muskulatūra, aknas, nierēs, tauki) un pienā nedrīkst pārsniegt 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nitroimidazolu grupas preparātu atliekas dzīvnieku izcelsmes produkcijā nav pieļaujama.

Zinātniskajā literatūrā ir piedāvāti vairāki varianti sulfanilamīdu noteikšanai dzīvnieku izcelsmes produkcijā. Preparātu ekstrakcijai no parauga izmanto etilacetātu [24, 25, 26], acetonitrilu [27], dihlormetānu [28]. Paraugu attīrīšanai no traucējošām vielām izmanto cietās fāzes ekstrakciju uz C18 sorbenta [28], NH_2 sorbenta [24] vai silikagela [29]. Ir piedāvāti dažādi varianti sulfanilamīdu detektēšanai. Sulfanilamīdu koncentrācijas novērtēšanai var izmantot imunofermatīvo metodi vai plānslāņa hromatogrāfiju [30]. Mikrobioloģiska metode sulfanilamīdu noteikšanai nav pielietojama, jo analīzes jutība nav pietiekoša [11]. Augsti efektīvās šķīduma hromatogrāfijas metodes jutība ir 10-130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [31, 32, 33, 34], gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodes jutība ir 25-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [27]. Ņemot vērā nepieciešamību pirms mērīšanas ar gāzu hromatogrāfu – masspektrometru veikt sulfanilamīdu savienojumu derivatizāciju, par optimālāku metodi šo preparātu noteikšanai var uzskatīt šķīduma hromatogrāfiju – masspektrometrijas metodi [26, 27, 35].

Nitroimidazolu grupas savienojumu noteikšanai literatūrā ir aprakstīta gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode [36]. Viena preparāta no nitroimidazolu grupas (dimetridazols) atlieku noteikšanai piedāvāta arī šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode [37].

Neskatoties uz tēmas izklāstu vairākās publikācijās, pieejamā literatūrā nav sastopama iespēja veikt paraugu sagatavošanu, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfijas metodi. Nav piedāvāts arī variants veikt paraugu sagatavošanu un detektēšanu, lai vienlaicīgi varētu noteikt sulfanilamīdu un nitroimidazolu saturu.

1.1.3. Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi un to atlieku noteikšanas metodes

Nesteroīdie pretiekaisuma līdzekļi ir plaša veterināro preparātu grupa, kas apvieno vairākas ķīmisko vielu klases [23]. Šajā pētījumā ir izstrādātas metodes propionskābes atvasinājumu (naproksēns, fenoprofēns, ketoprofēns), feniletikskābes atvasinājuma (diklofenaks) un pirazolona atvasinājuma (fenilbutazons) noteikšanai. Visiem nesteroīdiem pretiekaisuma līdzekļiem piemīt pretsāpju, pretdrudža, pretiekaisuma un pretreimatiska darbība. Saskaņā ar literatūras datiem, 93% no veterinārārstiem izmanto nesteroīdos pretiekaisuma līdzekļus dzīvnieku ārstēšanai, turklāt 60% no ārstiem izmanto šos preparātus biežāk nekā vienu reizi nedēļā.

Fenilbutazons pēc farmakoloģiskām īpašībām ir līdzīgs analģīnam, bet aktivitātes ziņā stipri pārspēj to. Tam ir nosacīti ātrāka un ilgstošāka darbība. Sakarā ar izteikto pretiekaisuma un pretreimatisma aktivitāti, fenilbutazonu lieto reimatisma un dažādu poliartrīta formu ārstēšanā. Pretiekaisuma darbības ziņā fenilbutazons pārspēj arī acetilsalicilskābi. Fenilbutazons ir ļoti toksisks, tas kairina gremošanas trakta gļotādu, izraisa sliktu dūšu, vemšanu, sāpes vēderā. Ilgstoši lietojot, var izveidoties kuņģa vai divpadsmitpirkstu zarnas čūla.

Propionskābes atvasinājumu grupas preparātiem ir izteikta pretiekaisuma darbība, kā arī praksē izmantojama pretsāpju un pretdrudža darbība. Šo preparātu galvenā priekšrocība ir tā, ka tiem ir laba panesamība, salīdzinoši reti izraisa blakusparādības. Naproksēns no pārējiem šīs grupas preparātiem atšķiras ar to, ka tam ir vairāk izteikta pretsāpju darbība un to efekts ir ilgstošāks.

Diklofenaks analģētiskās un pretiekaisuma darbības ziņā pārspēj acetilsalicilskābi, fenilbutazonu un ibuprofēnu. Diklofenaku lieto arī nereimatiskas dabas iekaisumu un akūtu sāpju gadījumos. Diklofenaku parasti panes labi, bet reizēm (20% cilvēku) var būt traucējumi gremošanas trakta darbībā (vemšana, caurejas, atraugas, sāpes vēderā), kā arī galvassāpes,

reibonis, bezmiegs, redzes, dzirdes un jušanas traucējumi, ādas alergiskas reakcijas, bronhiālās astmas lēkme un pat šoks.

Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu noteikšanas metodes visbiežāk tiek izmantotas sporta zirgu dopinga kontrolei [38], produktīvo dzīvnieku pārbaudei [39] vai atlieku noteikšanai notekūdeņos [40].

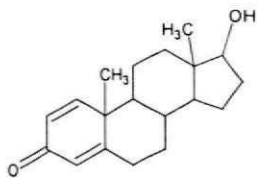
Analīzei izmanto šķidrums – šķidrums ekstrakciju no seruma paraugiem ar etilacetātu [41], benzola – cikloheksāna maisījumu (1:1) [42] vai cietās fāzes ekstrakciju ar C18 kolonnām [39, 43]. Ir aprakstīta arī tiešā plazmas analīze ar šķidrums hromatogrāfu pēc olbaltumvielu izgulsnēšanās ar acetonitrilu [44] vai ultrafiltrāciju [45].

Savienojumu detektēšanai visbiežāk tiek izmantota šķidrums hromatogrāfijas metode ar UV detektoru [39, 41, 42, 43] vai gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode [46, 47]. Tomēr aprakstīto metožu jutība nav pietiekoša, lai analīzes varētu efektīvi izmantot pārtikas produktu kontrolē. Literatūrā ir norādes uz metožu jutību no 25-50 ng/ml [41, 45] līdz 500 ng/ml [43]. Bez tam visas literatūrā aprakstītās metodes ir izstrādātas nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu noteikšanai plazmā vai urīnā, kas satur mazāk traucējošo vielu salīdzinājumā ar pienu vai gaļu. Literatūrā nav aprakstīta arī veterināro preparātu metilēšanas procedūra, izmantojot trimetilsilildiazometānu, kas nodrošina augstu iznākumu bez tiešās diazometāna pielietošanas. Ņemot vērā fenilbutazona toksiskumu un tā lietošanas aizliegumu, ir nepieciešams izstrādāt un ieviest noteikšanas metodi ar jutību vismaz 5 µg/kg.

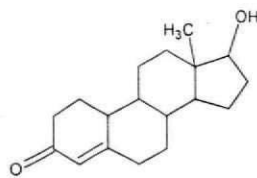
1.1.4. Hormonālie preparāti un augšanas stimulatori. Noteikšanas metodes

Hormonālo savienojumu un augšanas stimulatoru grupas apvieno vairākas ķīmisko vielu klases. Saskaņā ar klasifikāciju, kas ir aprakstīta Eiropas Savienības direktīvā 96/23/EEC, šie savienojumi tiek iedalīti vairākās grupās:

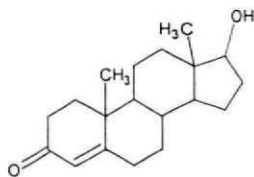
- A1 – stilbēni (heksestrols, dienostrols, dietilstilbestrols un citi);
- A2 – tireostati (2-tiouracils, 6-metil-2-tiouracils, 6-propil-2-tiouracils un citi);
- A3 – steroīdi (17 α -metiltestosterons, zeranols, boldenons, nandrolons, estradiols, testosterons, epitestosterons, progesterons, megestrola acetāts, medroksiprogesterona acetāts, estriols, estrons, cis-androsterons, hidroksiprogesterons un citi);
- A4 – zeranols;
- A5 – beta-agonisti (klenbuterols, salbutamols, mabuterols, cimaterols un citi).



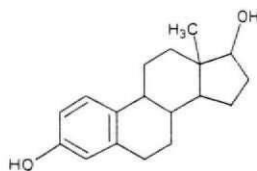
Boldenons



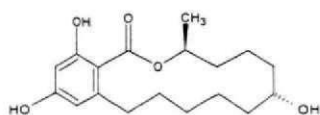
Nandrolons



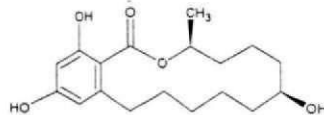
Testosterons



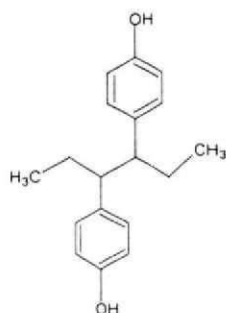
17β estradiols



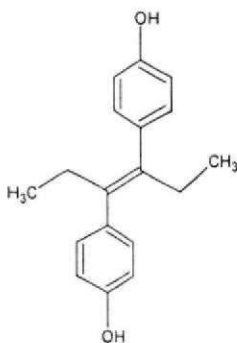
Zeranol



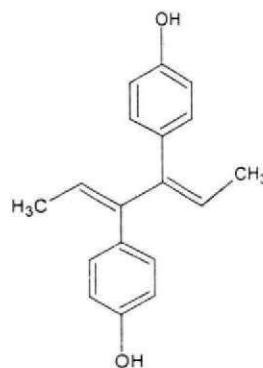
Talaranol



Heksestrols



Dienostrols



Dietilstilbestrols

1.att.Dažu hormonālo savienojumu struktūrshēmas.

Laika posmā no 1970 līdz 1980 gadu sākumam šie preparāti plaši tika izmantoti lauksaimniecībā. Tomēr 1985.gadā Eiropas Savienības direktīva 85/649 noteica aizliegumu A1, A2, A4 un A5 grupas preparātu lietošanai produktīvajiem dzīvniekiem. Tādējādi, jebkurš šo vielu atlieku koncentrāciju līmenis liecina par dzīvnieku izcelsmes produkcijas neatbilstību nekaitīguma kritērijiem. Līdz ar to svarīgākie analītiskās metodes parametri ir noteikšanas jutība un identificēšanas drošība.

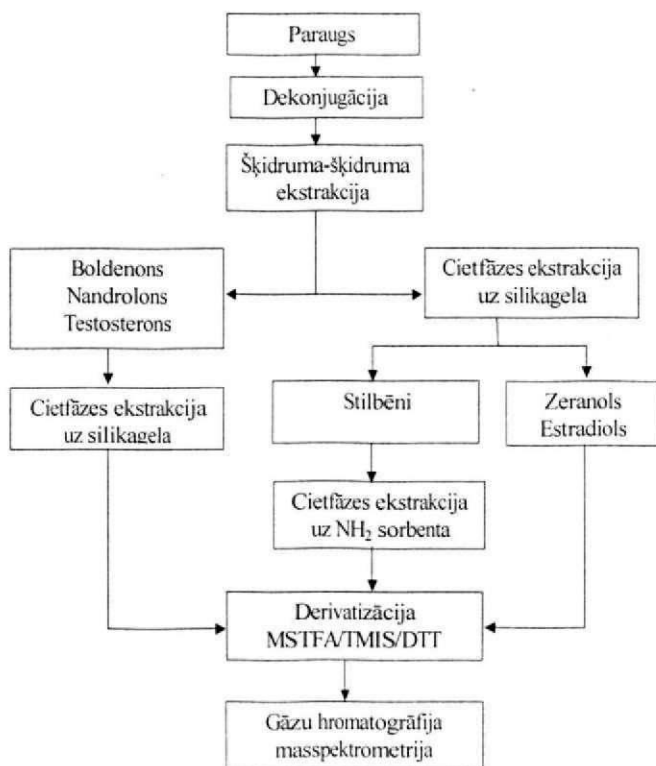
A3 grupas savienojumi iedalās divās grupās: naturālie steroīdi (estradiols, testosterons, progesterons utt.) un sintētiskie preparāti (nandrolons, boldenons, 17α-metiltestosterons). Naturālo steroīdu paaugstināts līmenis var liecināt par augšanas stimulatoru nelegālo izmantošanu. Sintētisko A3 grupas preparātu lietošana ir aizliegta.

Augšanas stimulatoru grupas savienojumi pastiprina barības vielu uzņemšanu un pārvēršanu šūnās un audos un olbaltumvielu sintēzi. Tas izpaužas skeleta muskuļu iekšējo orgānu un kaulaudu masas pieaugumā. Vienlaicīgi palielinās arī ķermeņa kopējā masa. Organismā tiek aizturēts kalcijs, slāpeklis, kālijs, fosfors un sērs.

Zinātniskajā literatūrā ir piedāvātas vairākas metodes hormonālo preparātu un augšanas stimulatoru noteikšanai [11]. Lielākā daļa no metodēm ir paredzēta tikai vienas savienojumu grupas noteikšanai. Visbiežāk hormonālo līdzekļu atlieku analīzēm tiek izmantotas šādas metodes:

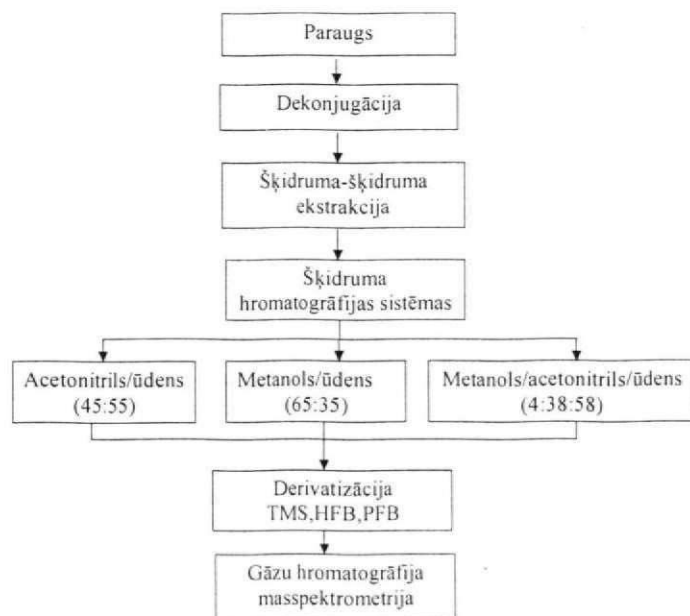
- *imunofermentatīvā metode*. Ir izstrādāti un pieejami vairāki komerciālie komplekti A1, A3, A4 un A5 grupas savienojumu noteikšanai. Metodei piemīt vairākas priekšrocības; tā ir ātra un jutīga. Izmantojot imunofermentatīvo metodi, ir iespējams veikt liela paraugu skaita analīzes. Metodes trūkumi ir saistīti ar to, ka metode ir jutīga tikai pret ierobežotu savienojumu skaitu, pozitīvos paraugus ir nepieciešams apstiprināt, izmantojot instrumentālās metodes (hromatogrāfiju, masspektrometriju);
- *plānslāņa hromatogrāfijas metode*. Līdz šim izmanto stilbēnu grupas savienojumu, 19-nortestosterona, trenbolona, tireostatu noteikšanai. Ņemot vērā stingras Eiropas Savienības direktīvu prasības pret metožu kvalitāti, analīzes pielietošanas sfēra ir ierobežota. Metodei ir raksturīga neliela selektivitāte un jutība, paraugu sagatavošanas procedūras ir ļoti darbietilpīgas;
- *šķidrums hromatogrāfijas metode*. Metode ir pietiekami jutīga un selektīva. Izmanto dažu savienojumu noteikšanai. Tomēr, izmantojot UV vai fluorescences detektorus, nav iespējams veikt savienojumu identifikāciju atbilstoši Eiropas Komisijas lēmumam 2002/627/EC [48]. Perspektīva ir šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metodes (AEŠH-MS-MS) izmantošana aizliegto preparātu noteikšanai. Tomēr AEŠH-MS-MS jutība būtiski samazinās, ja vienlaicīgi ir nepieciešams analizēt līdz pat 20 savienojumus, tātad, izmantojot 40 MRM kanālus. Bez tam metodes ieviešanu kavē lielas aparatūras izmaksas;
- *gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode* [49]. Metode ir jutīga un selektīva. Izvēloties katram savienojumam četrus jonus SIM režīmā, ir iespējams veikt savienojumu identifikāciju atbilstoši Eiropas Komisijas lēmuma 2002/627/EC prasībām. Kapilārās gāzu hromatogrāfijas augstā izšķiršanas spēja un masspektrometrijas selektivitāte ļauj vienas hromatogrammas laikā noteikt vairākus savienojumus.

No vairākām publikācijām zinātniskajā literatūrā, var izdalīt divas pieejas vairāku hormonālo savienojumu vienlaicīgas analīzes veikšanā. Visvairāk izplatītajā metodē [50] izmanto hormonālo savienojumu ekstrakciju ar metanola – ūdens maisījumu, tauku atdalīšanu ar heksānu, analizējamo vielu šķidrums – šķidrums ekstrakciju no metanola – ūdens maisījuma ar dihlorometānu un vielu sadalīšanu dažādās grupās (estrogēni, androgēni un gestagēni) ar celīta un alumīnija oksīda kolonnu. Katrai grupai tiek izmantots cits sililējošais derivatizācijas reaģents. Paraugu sagatavošanas shēma ir parādīta 2. attēlā.



2. att. Klasiskā hormonālo savienojumu atlieku analīzes shēma

Citā paraugu sagatavošanas variantā izmanto preparatīvo šķidrums hromatogrāfiju [11]. Veicot gradienta eluēšanu, ir iespējams selektīvi izdalīt dažādas hormonālo preparātu un augšanas stimulatoru grupas. Pēc dažādu savienojumu grupu sililēšanas veic noteikšanu ar gāzu hromatogrāfu – masspektrometru. Procedūra ir parādīta 3. attēlā.



3. att. Paraugu sagatavošana, izmantojot preparatīvo šķidruma hromatogrāfiju

Aprakstīto metožu trūkums ir saistīts ar nepieciešamību veikt atsevišķu paraugu sagatavošanu dažādām hormonālo savienojumu grupām. Bez tam dažādām vielu grupām tiek izmantotas arī dažādas derivatizēšanas reakcijas un līdz ar to, veicot savienojumu noteikšanu, ir nepieciešams uzņemt vairākas hromatogrammas.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Levamizola noteikšana ar GH-MS metodi PĶJ un EJ režīmā

2.1.1. Analīzes princips.

Metode ietver parauga homogenizēšanu sārmainā šķīdumā un etilacetātā, ekstrakta attīrīšanu ar šķīduma - šķīduma ekstrakciju un levamizola satura noteikšanu, izmantojot GH-MS metodi EJ vai PĶJ režīmā.

2.1.2. Reaģenti

Hloroforms (*Baker / Baker Analysed*)

Etilacetāts (*Baker / Baker Analysed*)

Kālija hidroksīds (*Sigma / analītiski tīrs*)

Metanols (*Baker / For organical residue analysis*)

Koncentrēta sālsskābe (*Acros / analītiski tīra*)

Bezūdens nātrija sulfāts (*Acros / analītiski tīrs*)

Dejonizēts ūdens - MilliQ attīrīšanas sistēma

2.1.3. Šķīdumi

50% (m/V) kālija hidroksīda šķīdums. Uzmanīgi izšķīdina 250g KOH 400 ml ūdens. Uzpilda līdz 500 ml.

0,5M sālsskābes šķīdums. Uzmanīgi pieliek 22 ml koncentrētas sālsskābes 400 ml ūdens un uzpilda līdz 500 ml.

2.1.4. Standarti

Levamizola hidrochlorīds (*Sigma*) Pamatšķīdums: 50 mg levamizola izšķīdina metanolā un atšķaida līdz 50 ml. Sagatavo katru mēnesī.

Levamizola iekšējā standarta (levamizols-d5) šķīdums 1 ng/μl (RIVM).

2.1.5. Darba šķīdumi

1 ml pamatšķīduma atšķaida līdz 100 ml ar hloroformu. Beigu koncentrācija ir 10 mg/ml. Sagatavo katru dienu. 1 ml, 2 ml un 5ml iegūtā šķīduma atšķaida līdz 10 ml ar hloroformu. Beigu koncentrācijas ir 1, 2 un 5 μg uz ml. Sagatavo katru dienu.

2.1.6. Standartpiedevas pievienošanas procedūra.

Izmantojot darba šķīdumus, pievieno 1 ml standartšķīduma un 100 µl iekšējā standarta šķīduma 5 g parauga. Iztur 15 minūtes.

2.1.7. Aparatūra un trauki

Centrifūgas polipropilēna mēģenes 50 ml.

Koniskās centrifūgas polipropilēna mēģenes 12 ml.

Koniskās centrifūgas polipropilēna mēģenes 10 ml.

Mērcilindri, A klases 25ml, 500ml un 1L

Mērkolbas, A klases 10, 25, 50, 100 un 500 ml

Graguētas stikla pipetes 1, 2 un 5 ml

Vārglāzes 100, 200 un 500 ml un 1L

Stikla mikrošķirce 200 µl

Centrifūga - *MSE Mistral*

Homogenizators - *UltraTurrax*

Kratītājs - *BioSan*

Stikla mikropudeles 1,5 ml ar ieliktniem

200 µl mikropudelītes

Svari – *Kern 770-60* ar precizitāti 0,01 mg un svēršanas diapazonu līdz 60g

Sildīšanas iekārtas un slāpekļa ietvaicēšanas sistēma

Automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu 200, 1000, 5000 µl

2.1.8. GH-MS

Masu selektīvs detektors (*Hewlett Packard 5973*), kas savienots ar *Hewlett Packard* gāzu hromatogrāfu (*HP 6890*). Gāzu hromatogrāfs aprīkots ar automātisku paraugu ievadīšanas iekārtu (*HP 7683*)

2.1.9. Paraugu sagatavošana, izmantojot šķidrums – šķidrums ekstrakciju

Paraugu iesvaru (10 g vai ml) ievieto centrifūgas mēģenēs, pievieno 5g bezūdens nātrija sulfāta, 1 ml 50% KOH un 15 ml etilacetāta. Homogenizē maksimālā ātrumā 2 min. Horizontālā maisītājā paraugus maisa 15 min. Centrifugē 15 min ar 3000 apgr/min. Etilacetāta slāni pārnes citā mēģenē. Atkārto ekstrakcijas procedūru ar 15 ml etilacetāta. Atdala otro etilacetāta slāni un pievieno pirmajam.

20 ml iegūtā parauga pārnes centrifūgas mēģenē, pievieno 5 ml 0,5 M HCl, intensīvi krata 2 minūtes un tad centrifugē 5 min 3000 apgr/min. Atdala etilacetāta slāni. Ūdens slāni pārnes

tūrā centrifūgas mēģenē. Pievieno 1 ml 50% KOH šķīduma un sakrata. Pievieno 100 µl hloroforma, krata vienu minūti. Izmantojot 100 µl šļirci pārnes visu organisko slāni 200 µl pudelītē. Šļirci skalo ar 100 µl hloroforma un pārnes to pudelītē. Ietvaicē līdz sausam atlikumam slāpekļa plūsmā. Pievieno 100 µl hloroforma un izšķīdina samaisot. Gāzhromatogrāfiskai analīzei ņem 1 µl.

2.1.10. Paraugu sagatavošana, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju

Parauga iesvaram (5 g vai ml) pievieno 5 g bezūdens nātrija sulfāta, 1 ml 50% KOH un 15 ml etilacetāta. Veic levamizola ekstrakciju kā aprakstīts iepriekš. Atkārtoto ekstrakciju ar 15 ml etilacetāta. Apvieno etilacetāta slāņus un ietvaicē līdz sausam ar rotācijas ietvaicētāju. Izšķīdina sauso atlikumu 4 ml cikloheksāna / etilacetāta maisījuma (tilpuma attiecība 1:1). Šķīdumu filtrē caur 0,45 µm *Millipore Millex* filtru. Filtrātu (1 ml) hromatografē ar gelfiltrācijas kolonnu. Eluēšanas tilpums no 25 līdz 49 ml (kopā 24 ml). Ietvaicē šķīdumu līdz sausam un izšķīdina 100 µl izooktāna. Gāzhromatogrāfiskai analīzei ņem 1 µl šķīduma.

2.1.11. Paraugu sagatavošana levamizola noteikšanai, izmantojot cietās fāzes ekstrakciju ar Oasis MCX kolonnām.

Parauga iesvaram (5 g vai ml) pievieno 5 g bezūdens nātrija sulfāta, 1 ml 50% KOH un 15 ml etilacetāta. Veic levamizola ekstrakciju kā aprakstīts iepriekš. Atkārtoto ekstrakciju ar 15 ml etilacetāta. Apvieno etilacetāta slāņus. 20 ml iegūtā šķidrā parauga pārnes centrifūgas mēģenē un pievieno 5 ml 0,5 M HCl. Intensīvi krata ar roku 2 min un tad centrifugē 5 min ar 3000 apgr / min. Atdala etilacetāta slāni un cietās fāzes ekstrakcijai ar *Oasis MCX* (sorbenta masa – 60 mg) kolonnu ņem 4 ml 0,5 M HCl slāņa. Kondicionē *Oasis MCX* kolonnu ar 1 ml metanola un 1 ml ūdens. Uznes paraugu (4 ml 0,5 M HCl). Mazgā kolonnu ar 1 ml 1 N HCl un 1 ml metanola. Eluē levamizolu ar 2 ml 5% amonjaka šķīdumu metanolā. Paraugu ietvaicē un atkarībā no detektēšanas veida izšķīdina 100 µl izooktāna vai kustīgās fāzes.

2.1.12. Paraugu sagatavošana fentanila noteikšanai, izmantojot cietās fāzes ekstrakciju ar Oasis MCX kolonnām.

500 µl asinis plazmas pievieno 25 µl fosforskābes un samaisa. Kondicionē *Oasis MCX* kolonnu ar 1 ml metanola un 1 ml ūdens. Uznes paraugu un mazgā kolonnu ar 1 ml 0,1 N HCl un 1 ml metanola. Eluē fentanilu ar 2 ml 5% amonjaka šķīdumu metanolā. Paraugu ietvaicē un izšķīdina 100 µl metanola.

2.1.13. GH-MS analīze

Gāzu hromatogrāfa parametri:

Kolonna: 30m×0.25 mm DB5 fāzes 0,25 μm slānis

Injekcija: 1 μl

Temperatūra: GH-MS pārēja: 280°C

Injektors: 240°C

Temperatūras programma:

No temp. (°C)	Līdz temp. (°C)	Ātrums (°C/min.)	Laiks (min.)	Kopējais laiks (min)
60	240	30	6,0	6,0
240	240	-	4,0	10,0
240	260	10	2,0	12,0
260	260	-	5,0	17,0

Nēsējgāze: Hēlijs

Plūsmas ātrums = 1 ml/min

Masspektrometra parametri:

Elektronu triecienu jonizācija:

Elektronu enerģija 69,9 eV

Jonu avota temperatūra 230°C

Kvadrupola temperatūra 150°C

Spriegums uz elektrodiem 1247 V

Pozitīvā ķīmiskā jonizācija:

Elektronu enerģija 156,2 eV

Jonu avota temperatūra 250°C

Kvadrupola temperatūra 106°C

Spriegums uz elektrodiem 1153 V

2.1.14. Levamizola noteikšana ar AEŠH-MS-MS sistēmu.

Šķidrums hromatogrāfa parametri:

Waters Alliance 2690 šķidrums hromatogrāfs ar *Waters Symmetry C18* 5 μm 3,9×150 mm kolonnu. Izokratisks režīms: 60% H₂O, 39% CH₃OH, 1% CH₃COOH. Hromatogrammas laiks 8 minūtes, plūsmas ātrums 1 ml/min, injekcijas tilpums 10 μl.

Masspektrometrijas parametri:

Micromass Quattro LC masspektrometrs ar trīskāršo kvadrupolu sistēmu (AEŠH-MS-MS mērījumiem). Pozitīvās elektriskās izsmidzināšanas jonizācijas režīms. Skanēšanas veids: MRM. Skanēšanas pāreja: 205 → 178. Spriegums uz konusa: 35,0 V, sadursmju enerģija: 22,0 eV, spriegums uz kapilāra: 3,5 kV

2.1.15. Fentanila noteikšana ar AEŠH-MS-MS sistēmu.

Šķidrums hromatogrāfa parametri:

Waters Alliance 2690 šķidrums hromatogrāfs ar *Waters Xterra MS C18* 3,5 μm 2,1×100 mm kolonnu. Izokratiskais režīms: 100% CH₃OH. Hromatogrammas laiks 5 minūtes, plūsmas ātrums 0,2 ml/min, injekcijas tilpums 10 μl.

Masspektrometrijas parametri:

Micromass Quattro LC masspektrometrs ar trīskāršo kvadrupolu sistēmu (AEŠH-MS-MS mērījumiem). Pozitīvās elektriskās izsmidzināšanas jonizācijas režīms. Skanēšanas veids: MRM, skanēšanas pārejas: 337 → 105; 337 → 135; 337 → 188. Spriegums uz konusa: 35,0 V, sadursmju enerģija: 22,0 eV, spriegums uz kapilāra: 3,5 kV

2.2. Hormonālo savienojumu atlieku noteikšana gaļā, plazmā un urīnā ar GH-MS metodi

2.2.1. Analīzes princips un pielietojanas sfēra

Metode ietver šādus etapus:



2.2.2. Reaģenti un materiāli

Tertbutilmetilēteris (*Acros* / 99%)

Metanols (*Baker* / for organical residue analysis)

Heksāns (*Labskan* / *Pestiscan*)

Dihlormetāns (*Acros* / HPLC)

Acetons (*Acros* / HPLC)

Izooktāns (*Baker* / Baker analysed)

Heptafluorosviestskābes anhidrīds (*Alltech*)

Dejonizēts ūdens (*MilliQ* attīrīšanas sistēma)

Glukuronidāze, H2 tips (*Sigma* Kat.Nr.G0876)

C18 kolonnas, 100 mg sorbenta, 1cc (*J.T.Baker* vai *Waters*)

2.2.3. Šķīdumi

20% acetona šķīdums ūdenī. 100 ml mērcilindrā ielej 20 ml acetona un uzpilda līdz 100 ml ar ūdeni.

40% metanola šķīdums ūdenī. 100 ml mērcilindrā ielej 40 ml metanola un uzpilda līdz 100 ml ar ūdeni.

Acetāta buferšķīdums (0,04 mol/L). 25,2 g etiķskābes un 43,0 g $\text{CH}_3\text{COONa}\times 3\text{H}_2\text{O}$ izšķīdina 1000 ml ūdens.

Iekšējo standartu šķīdums. Dietilstilbestrola-d6, zeranola-d4, taleranola-d4 un testosterona-d2 šķīdumi etanolā ar koncentrāciju 1 ng/ μl .

2.2.4. Standartviela un standartšķīdumi

25 ml mērkolbās sagatavo savienojumu pamata standartšķīdumus metanolā ar koncentrāciju 1000 ng/ μl (ST1) (25 mg 25 mililitros). Izmantojot pamata standartšķīdumus, 50 ml mērkolbā sagatavo darba standartšķīdumu metanolā pēc šādas shēmas:

Darba standartšķīdumu sagatavošana

Savienojums	ST1 tilpums, μl	Vielas konc., ng/ μl	Savienojums	ST1 tilpums, μl	Vielas konc., ng/ μl
DEN	450	9	Testosterons	200	4
HEX	40	0,8	17 β Estradiols	200	4
DES	150	3	Zeranolis, taleranols	300	6
17 α -MeTestosterons	300	6	Progesterons	500	10
Boldenons	300	6	Megestrola acetāts	500	10
Nandrolons	300	6	Medroksiproģesterons	2000	40
Estriols	200	4	Hidroksiproģesterons	500	10
Estrons	200	4	Cis-androsterons	200	4

2.2.5. Aparatūra un trauki

Analītiskie svāri *Kern 770-60* ar precizitāti 0,01 mg un svēršanas diapazonu līdz 60g

Derivatizēšanas termobloks - *BioSan*

Centrifūga - *MSE Mistral*

Stikla pudelītes 22 ml

Derivatizēšanas stikla pudelītes 10 ml

Vakuuma manifolds *Alltech* un sūknis *Gast*

Graduētas stikla pipetes 10 un 20 ml

Mērkolbas, A klases 25 ml, 50 ml

Centrifūgas stikla mēģenes 10 ml

Automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu 200 un 1000 μ l

2.2.6. GH-MS

Masu selektīvs detektors (*Hewlett Packard 5973*), kas savienots ar *Hewlett Packard* gāzu hromatogrāfu (*HP 6890*).

2.2.7. Analīzes veikšana

Ekstrahē 5 g vai ml parauga divas reizes ar 5 ml tertbutilmetilētera (urīna paraugiem pirms analīzes pievieno 1 ml acetāta buferšķīduma ar pH 5,2 un 25 μ l glukuronidāzes un inkubē 2 stundas 37°C temperatūrā). Apvienotos tertbutilmetilētera slāņus ietvaicē līdz sausam slāpekļa plūsmā 40°C temperatūrā. Sauso atlikumu izšķīdina 3 ml metanola, pievieno 1 ml ūdens un iekšējo standartu vai standartpiedevu. Pievieno 5 ml heksāna un sakrata. Centrifugē 5 min ar 3000 apgr/min un atdala heksāna augšējo slāni. Apakšējam slānim pievieno 5 ml dihlormetāna un veic hormonālo savienojumu ekstrakciju CH_2Cl_2 slānī. Noņem augšējo slāni un mēģenes saturu ietvaicē līdz sausam slāpekļa plūsmā 40°C temperatūrā. Sauso atlikumu izšķīdina 1 ml 40% metanola šķīduma un veic cietās fāzes ekstrakciju. Kondicionē C18 kolonnu ar 1 ml metanola un 1 ml ūdens. Uznes 1 ml parauga un mazgā kolonnu ar 1 ml 40% metanola šķīdumu un 1 ml 20 % acetona šķīdumu. Eluē hormonālos savienojumus ar 2x1 ml metanola. Derivatizācijas mēģenēs ietvaicē metanola šķīdumu līdz sausam un pievieno 75 μ l acetona un 25 μ l heptafluorosviestskābes anhidrīda. Veic derivatizācijas reakciju 1 stundu 60°C, ietvaicē šķīdumu līdz sausam un atlikumu izšķīdina 50 μ l izooktāna. Izooktānu pārnes autosamplera pudeļu ieliktnos un izmanto noteikšanai ar GH-MS

2.2.8. GH-MS analīze

Gāzu hromatogrāfa parametri:

Kolonna: 30m×0,25 mm DB5 fāzes 0,25 μ m slānis

Injekcija: 1 μ l

Temperatūra: GH-MS pārēja: 280°C

Injektors: 250°C (Plūsmas dalītājs 1:5)

Temperatūras programma:

No temp. (°C)	Līdz temp. (°C)	Ātrums (°C/min.)	Laiks (min.)	Kopējais laiks (min)
100	100	-	2	2
100	200	15	6.67	8.67
200	200	-	9	17.67
200	280	10	8	25.67
280	280	-	10	36.67

Nēsējgāze: hēlijs, plūsmas ātrums = 1 ml/min

Masspektrometra parametri:

EJ vai NĶJ režīms.

NĶJ jonizācija SIM režīms:

Laiks, min	Savienojumi	Joni
10,00	DEN, HEX, DES	442, 446, 444, 461, 465, 463
17,00	17 α -metilttestosterons	442, 460, 771, 615
21,00	Zeranolis, taleranolis	499, 694, 713, 714, 717
22,00	Boldenons	442, 462, 658, 678
22,80	Nandrolons, testosterons, 17 β -estradiols, estriols, estrons	646, 660, 644, 450, 444, 645
25,00	Progesterons, hidroksiprogesterons	454, 472, 490, 509
30,00	Megestrola acetāts; medroksiprogesterona acetāts	738, 740, 758, 760

EJ jonizācija SIM režīms:

Laiks, min	Savienojumi	Joni
10,00	DEN, HEX, DES	303, 330, 331, 332, 417, 445, 447, 461, 629, 631, 658, 660, 666
21,00	Boldenons	343; 369; 464; 678
22,10	Nandrolons	306, 453, 666
22,65	Testosterons, 17 β -estradiols	409, 451, 467, 664, 665, 680, 682

2.3. *Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu atlieku noteikšana ar GH-MS metodi*

2.3.1. *Analīzes princips.*

Metode ietver parauga homogenizēšanu skābā vidē un heksānā, ekstrakta attīrīšanu ar šķīduma / šķīduma ekstrakciju, savienojumu metilēšanu un nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu noteikšanu, izmantojot GH-MS metodi elektronu trieciena jonizācijas režīmā.

2.3.2. *Reaģenti*

Heksāns (*Labskan / Pestiscan*)

Dihlormetāns (*Acros / HPLC*)

Nātrija hidroksīds (*Sigma / analītiski tīrs*)

Koncentrēta sērskābe (*Acros / analītiski tīra*)

Bezūdens nātrija sulfāts (*Acros / analītiski tīrs*)

Dejonizēts ūdens - *MilliQ* attīrīšanas sistēma

2.3.3. *Šķīdumi*

0,5 M nātrija hidroksīda šķīdums. Uzmanīgi izšķīdina 40g NaOH 400 ml ūdens. Uzpilda līdz 1000 ml ar ūdeni.

2 M sērskābes šķīdums. Uzmanīgi pieliek 98 g koncentrētas sērskābes 400 ml ūdens un uzpilda līdz 500 ml.

2.3.4. *Standarti*

Fenilbutazons (*Aldrich*), ketoprofēns (*Sigma*), diklofenaks (*Sigma*), naproksens (*Sigma*), fenoprofēns (*Sigma*). Sagatavo vielu standartšķīdumus metanolā ar koncentrāciju 1 mg/ml.

Sagatavojot darba šķīdumus, 1 ml pamatšķīduma atšķaida līdz 100 ml ar metanolu. Beigu koncentrācija ir 10 ng/μl. Sagatavo vienu reizi mēnesī. Darba šķīdumu ar koncentrāciju 1 ng/μl sagatavo, atšķaidot šķīdumu ar koncentrāciju 10 ng/μl 10 reizes ar metanolu.

2.3.5. *Aparatūra un trauki*

Centrifūgas polipropilēna mēģenes 50 ml.

Mērcilindri 25ml, 500ml un 1L

Mērkolbas 10, 25, 50, 100 ml

Centrifūga ar apgriezīenu skaitu vismaz 3000 apgr./min

Homogenizators - *UltraTurrax*

Kratītājs - *BioSan*

Stikla mikropudeles 1,5 ml ar ieliktniēm

200 µl mikropudelītes

Svari -*Kern 770-60* ar precizitāti 0,01 mg un svēršanas diapazonu līdz 60g

Sildīšanas iekārtas un slāpekļa ietvaicēšanas sistēma

Automātiskās pipetes ar maināmo tilpumu 200, 1000, 5000 µl

2.3.6. GH-MS

Masu selektīvs detektors (*Hewlett Packard 5973*), kas savienots ar *Hewlett Packard* gāzu hromatogrāfu (HP 6890). Gāzu hromatogrāfs aprīkots ar automātisku paraugu ievadīšanas iekārtu (HP 7683)

Gāzu hromatogrāfijas kolonna - 30m×0,25 mm DB5 fāzes 0,25 µm slānis.

2.3.7. Analīzes veikšana

Parauga iesvaru 5,0 g ievieto centrifūgas mēģenēs, un kontrolparaugiem pievieno savienojumu standartpiedevu (50 ng/g). Mēģenēs pievieno 3g bezūdens nātrija sulfāta, vienmērīgi sadalot to virs parauga. Katrai mēģenei pievieno 1 ml 2 M H₂SO₄ un 10 ml heksāna. Homogenizē maksimālā ātrumā 2 min ar *Ultra-Turrax*. Horizontālā maisītājā paraugus maisa 15 min. Centrifugē 15 min ar 3000 apgr/min. 5 ml heksāna slāņa pārnes 10 ml stikla centrifūgas mēģenē. Pievieno 2 ml 0,5 M NaOH šķīduma, intensīvi 2 min krata ar roku un tad centrifugē 5 min ar 3000 apgr/min. Atdala heksāna slāni. Ūdens slānim pievieno 1 ml 2 M H₂SO₄ šķīduma un sakrata. Pievieno 4 ml dihlormetāna, sakrata ar roku vienu minūti. Centrifugē 5 min ar 3000 apgr/min. Atdala ūdens slāni un dihlormetānu ietvaicē līdz sausam slāpekļa plūsmā. Sausam atlikumam pievieno 100 µl metanola un izšķīdina samaisot. Pievieno 20 µl trimetilsilidiazometāna, samaisa un pēc 10 minūtēm ietvaicē līdz sausam slāpekļa plūsmā. Atlikumu izšķīdina 100 µl cikloheksāna. Gāzhromatogrāfiskai analīzei ņem 1 µl.

2.3.8. GH-MS analīze

Gāzu hromatogrāfa parametrus:

Injekcija: 1 µl

Temperatūra: GH-MS pārēja: 280°C, injektors 250°C

Temperatūras programma:

No temp. (°C)	Līdz temp. (°C)	Ātrums (°C/min.)	Laiks (min.)	Kopējais laiks (min)
100	100	-	2,0	2,0
100	240	10	14,0	16,0
240	240	-	6,0	22,0
240	280	20	2,0	24,0
280	280	-	12	36,0

Nēsējgāze: Hēlijs, plūsmas ātrums = 1 ml/min

Masspektrometra parametri:

SIM jonu izvēle:

Fenoprofēns: 256, 197, 198 Da

Naproksēns: 185, 186, 244 Da

Ketoprofēns: 268, 209, 191 Da

Dilofenaks: 309, 308, 183, 252 Da

Fenilbutazons: 322, 279, 247 Da

2.4. Sulfanilamīdu un nitroimidazolu atlieku noteikšana ar AEŠH-MS-MS metodi

2.4.1. Analīzes princips.

Metode ietver parauga homogenizēšanu un savienojumu ekstrakciju acetonitrilā vai etilacetāta – cikloheksāna maisījumā, lipīdu atdalīšanu ar heksānu vai gelfiltrācijas hromatogrāfiju un veterināro preparātu atlieku noteikšanu ar AEŠH-MS-MS metodi atmosfēras spiediena ķīmiskās jonizācijas režīmā;

2.4.2. Reāģenti

Heksāns (*Labsan / Pestiscan*)

Acetonitrils (*Acros / AEŠH*)

Dejonizēts ūdens, *Milli Q* (18,2 MΩ)

Standartvielas: sulfadimidīns, sulfahloropiridazīns, dapsons, sulfatiazols, trimetoprimis, ronidazols, metridazols (*Riedel-de-Haen*); sulfanilamīds, sulfadiazīns, sulfadimetoksīns, sulfametizols (*Sigma*)

2.4.3. Iekārtas

Micromass Quattro LC masspektrometrs ar trīskāršo kvadropolu sistēmu, *Waters Alliance* 2690 šķidrums hromatogrāfs ar *Waters Symmetry C18* 5 μm 3,9×150 mm kolonnu.

Automātiska paraugu ievadīšanas iekārta, *Waters 717 plus*

AEŠH sūknis, *Waters 515*

Stikla hromatogrāfijas kolonna (d=10 mm, l=500mm), pildīta ar sorbentu *Bio-Beads S-X3*, *Bio – Rad Laboratories*

Fraciju kolektors, *Waters II*

Iztvaicētājs *Büchi, Rotavapor R-114, Waterbath B-480*

Homogenizators *Ultra – Turrax, T 25basic, IKA - WERKE*

Centrifūga *MSE Mistral 2000R*

Centrifūga *MPW - 310*

Analītiskie svāri *Kern 770-60* ar precizitāti 0,01 mg un svēršanas diapazonu līdz 60g

Automātiska pipete 200÷1000 μl, *Labsystems*

A klases stikla mērkolbas, 25 ml, *Brand*

Piltuves d=5,5 cm, *Duran*

Kolbas iztvaicēšanai, *Schott*

Filtri *Millex, Millipore corporation*

Filtri *Ultrafree – MC, Millipore corporation*

2.4.4. Paraugu sagatavošana, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju

Gaļas paraugam atdala taukus, 5 g iesver 50 ml centrifūgas mēģenē, pievieno 15 ml cikloheksāna – etilacetāta maisījuma (1:1) un homogenizē ar *Ultra – Turrax*. Krata 10 min un 10 min centrifugē ar 3000 apgr/min 15°C temperatūrā. Ekstraktu filtrē caur filtru, kurā iebērts nātrija sulfāts, paraugam pievieno vēl 15 ml cikloheksāna – etilacetāta maisījuma (1:1) un atkārti ekstrahē. 30 ml ekstrakta iztvaicē ar rotācijas ietvaicētāju 40°C temperatūrā. Sausam atlikumam pievieno 4 ml cikloheksāna – etilacetāta maisījuma (1:1), filtrē caur *Millex* filtru un savāc to 4 ml stikla pudelēs.

Attīra paraugu, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju. Ieslēdz eluenta plūsmu ar ātrumu 0,5 ml/min un 30 min laikā līdzsvaro kolonnas gelu ar eluentu. Palielina eluenta plūsmas ātrumu līdz 1 ml/min un ievieto paraugus autosamplerā. Atbilstoši autosamplera programmai 1 ml parauga šķidrums tiek ievadīts kolonnā. Fraciju kolektors savāc frakciju no 24. līdz 49.min, kas atbilst mobilās fāzes tilpumam 25 ml. Iztvaicē šo frakciju, atlikumam pievieno 100 μl

acetonitrila – dejonizēta ūdens maisījuma (70:30). Nosaka veterināro zāļu atlieku koncentrāciju, izmantojot AEŠH-MS-MS.

2.4.5. Paraugu sagatavošana, izmantojot šķidrums – šķidrums ekstrakcija

Gaļas paraugam atdala taukus, 3 g nosver 50 ml centrifūgas mēģenē, pievieno 10 ml acetonitrila un homogenizē ar *Ultra – Turrax*. Krata 10 min un 10 min centrifugē ar 3000 apgr/min 15°C temperatūrā. Ekstraktu filtrē caur filtru, kurā iebērta nātrija sulfāts. Acetonitrila ekstraktam pievieno 15 ml heksāna, krata mēģeni un 10 min centrifugē ar 3000 apgr/min. Atdala heksāna slāni un ietvaicē acetonitrilu līdz sausam slāpekļa plūsmā 40°C temperatūrā. Sausam atlikumam pievieno 100 µl acetonitrila – dejonizēta ūdens maisījuma (70:30). Atkārti tauku atdalīšanas procedūru ar heksānu. Nosaka veterināro zāļu atlieku koncentrāciju, izmantojot AEŠH-MS-MS.

2.4.7. AEŠH-MS-MS parametri

Šķidrums hromatogrāfijas parametri:

Izokrātiskais režīms: 30% H₂O, 70% CH₃CN ar 0,01% heptafluorosviestskābi, hromatogrammas laiks 10 minūtes, plūsmas ātrums 0,8 ml/min un injekcijas tilpums 10 µl.

Masspektrometrijas parametri:

Pozitīvās atmosfēras spiediena ķīmiskās jonizācijas (ApCl⁺) režīms, uzdots jonu reakciju monitorings.

Savienojumu detektēšanas parametri:

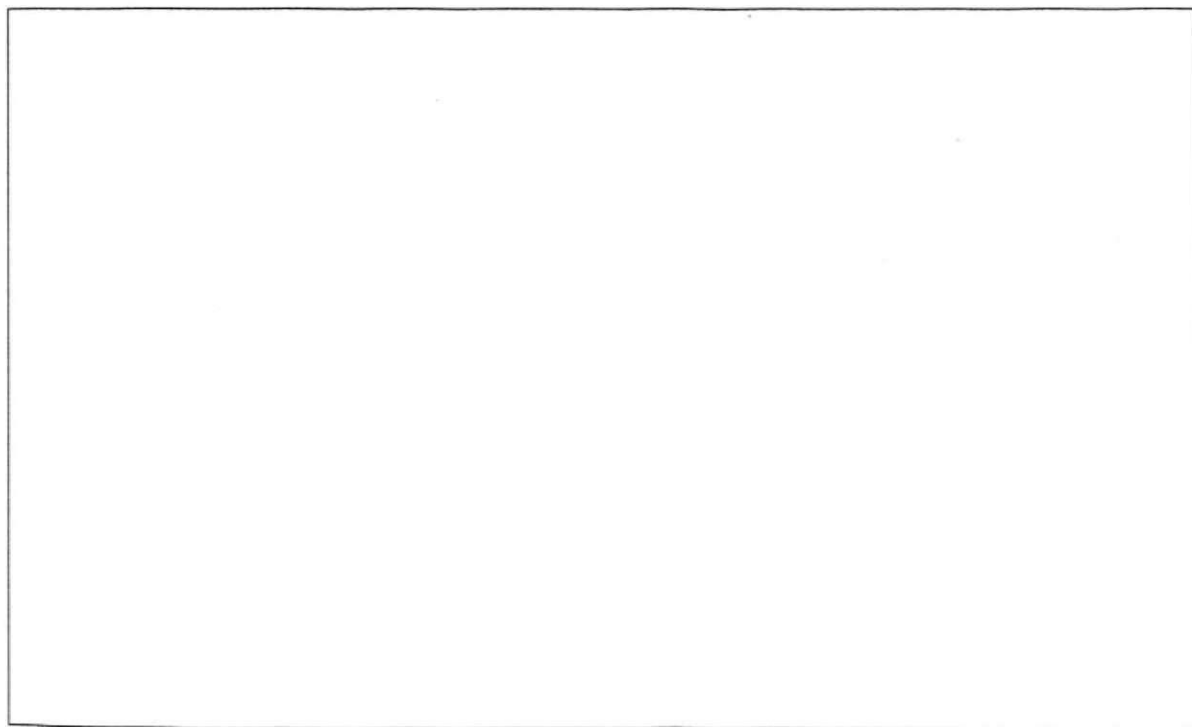
Nr.	Standartu nosaukums	Skatēšanas pārējās	Sadursmju enerģija, eV
1.	Sulfadimetoksīns	310,8 > 155,7	15
2.	Trimetoprimis	290,9 > 229,8	25
3.	Sulfahlorpiridazols	284,7 > 155,7	15
4.	Sulfadimidīns	278,8 > 185,7	15
5.	Sulfametizols	270,8 > 155,7	15
6.	Sulfatiazols	255,7 > 155,7	15
7.	Sulfanilamīds	213,7 > 172,7	8
8.	Metronidazols	172,0 > 128,0	10
9.	Ronidazols	201,0 > 140,0	12

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒŠANA

3.1. Levamizola atlieku noteikšanas metode

3.1.1. Levamizola masspektra uzņemšana ar dažādām jonizācijas metodēm.

Lai izmantotu masspektrometriju kvantitatīvajā analīzē un izvēlētos optimālus mērīšanas apstākļus, ir nepieciešama analizējamās vielas masspektra uzņemšana. Elektronu triecienu jonizācijas režīmā bāzes smaile ir 204 Da, kas pieder levamizola molekulārajam jonam. Iespējamā levamizola fragmentācijas shēma ir parādīta 4. attēlā.

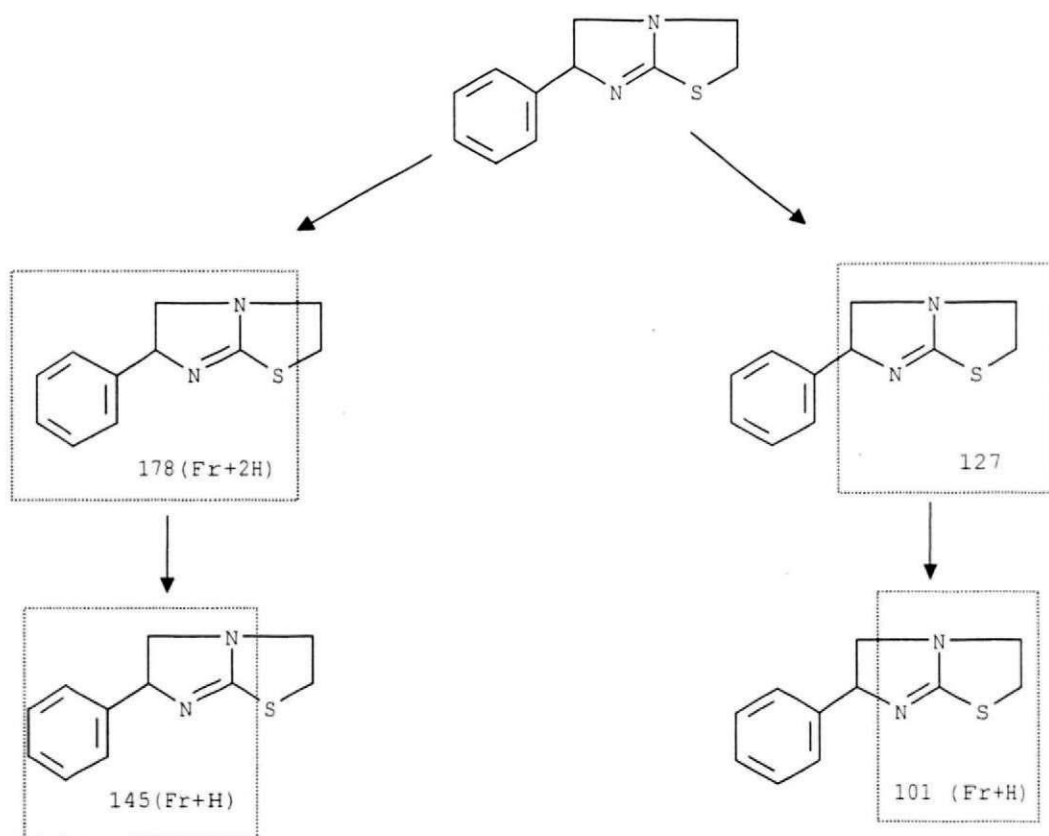


4.att. Levamizola fragmentācijas shēma EI jonizācijas apstākļos.

176 Da jona veidošanās ir saistīta ar cikla sabrukšanu un stabila neitrāla fragmenta $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ atšķelšanos. Šī sabrukšanas shēma viegli realizējas C-N un C-S saišu nestabilitātes dēļ [51]. Sakarā ar elektronu triecienu lielo enerģiju, 176 Da jonā notiek C-N un α -C-C saišu sabrukšana, veidojoties stabilam jonam 148 Da. Šī jona stabilitāti varētu izskaidrot ar tā ciklizāciju. Jona 127 Da veidošanās notiek sabrūkot saitei starp diviem cikliem - benzola un 2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1b]tiazola.

Negatīvās ķīmiskās jonizācijas ar metānu masspektram bāzes smaile ir $(\text{M-H})^-$. Tātad, levamizolam NĶJ režīmā vairāk raksturīgas protona pārnese reakcijas nevis elektrona satveres procesi. Jona 148 Da veidošanās varētu notikt līdzīgi EJ jonizācijas procesam.

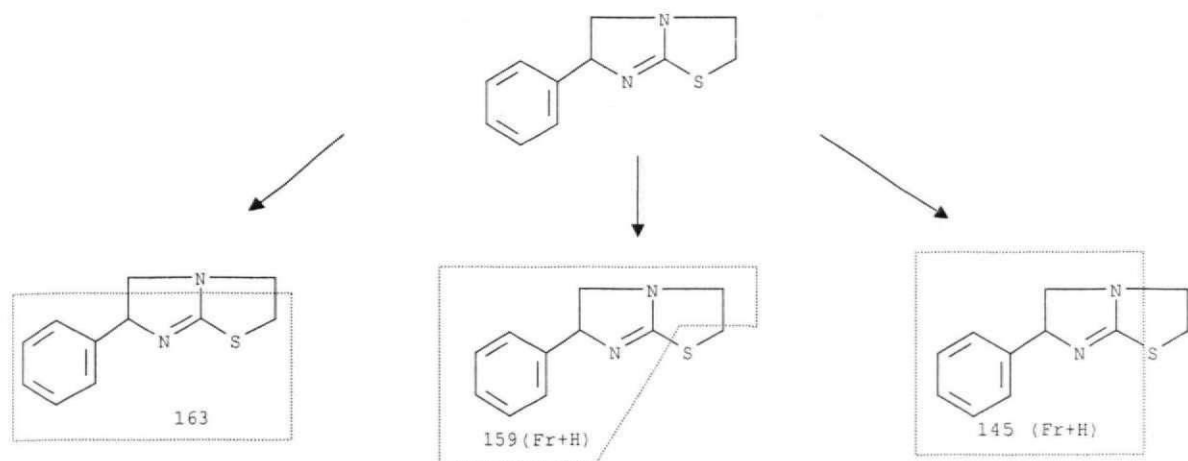
Pozitīvās ķīmiskās jonizācijas ar metānu masspektram ir raksturīga mazāka fragmentācija, salīdzinot ar EJ režīmu. Bāzes smaile ir $(M+H)^+$, kas veidojas protona pārnese procesā. Iespējamā fragmentācijas shēma ir piedāvāta 5. att.



5. att. Levamizola fragmentācijas shēma PĶJ jonizācijas apstākļos.

Jona 178 Da veidošanos ietekmē saišu C-N un C-S nestabilitāte. Pēc $CH_2=CH_2$ atšķelšanās jons pievieno 2 protonus, jo protonu pārnese procesi PĶJ režīmā ir ar lielu varbūtību. Dotajos apstākļos saites C-S sašķelšanās notiek izdevīgāk nekā cikla atvēršanās, tāpēc veidojas jons 145 Da. Jona 127 Da veidošanās PĶJ režīmā notiek līdzīgi kā EJ apstākļos. Tālākā 127 Da jona fragmentācija notiek ar $CH_2=CH_2$ atšķelšanos, sabrūkot divām C-N saitēm.

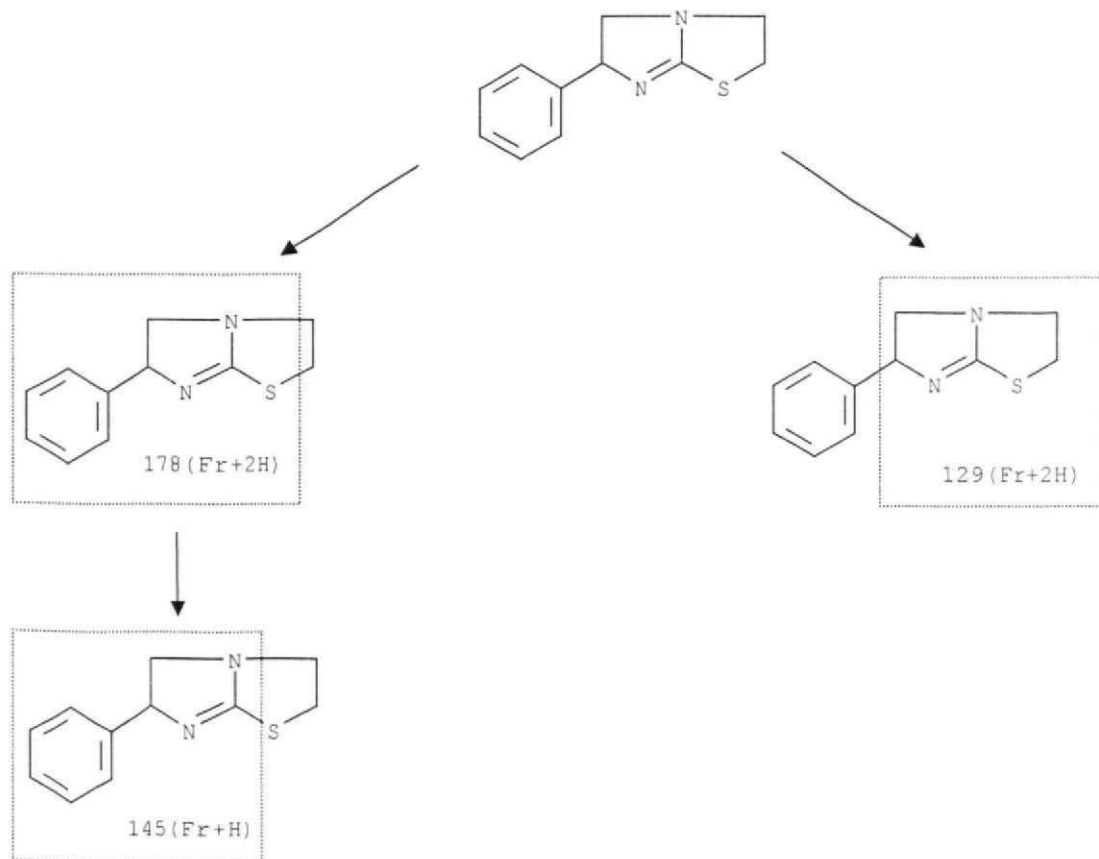
Jona 163 Da veidošanās ES+ režīmā (6.att.) izskaidrojama ar C-N un divu α -C-C saišu sabrukšanu.



6. att. Levamizola fragmentācijas shēma ES+ jonizācijas apstākļos.

Ļoti iespējams, ka 163 Da jons stabilizējas veidojot pieclocēkļu ciklu. Jona 159 Da veidošana notiek atšķēloties $\text{CH}_2=\text{S}$ fragmentam. 145 Da jons veidojas līdzīgi PĶJ fragmentācijas shēmai.

Veicot MS/MS mērījumus, kvadrupola Q_1 parametri tika uzstādīti, lai tas filtrētu tikai 205 Da jonus. Reakciju kamerā Q_2 205 Da jona sadursmju ar argona atomiem rezultātā tas fragmentējas tālāk. Fragmentācijas shēma ir visai līdzīga fragmentācijai PĶJ apstākļos.



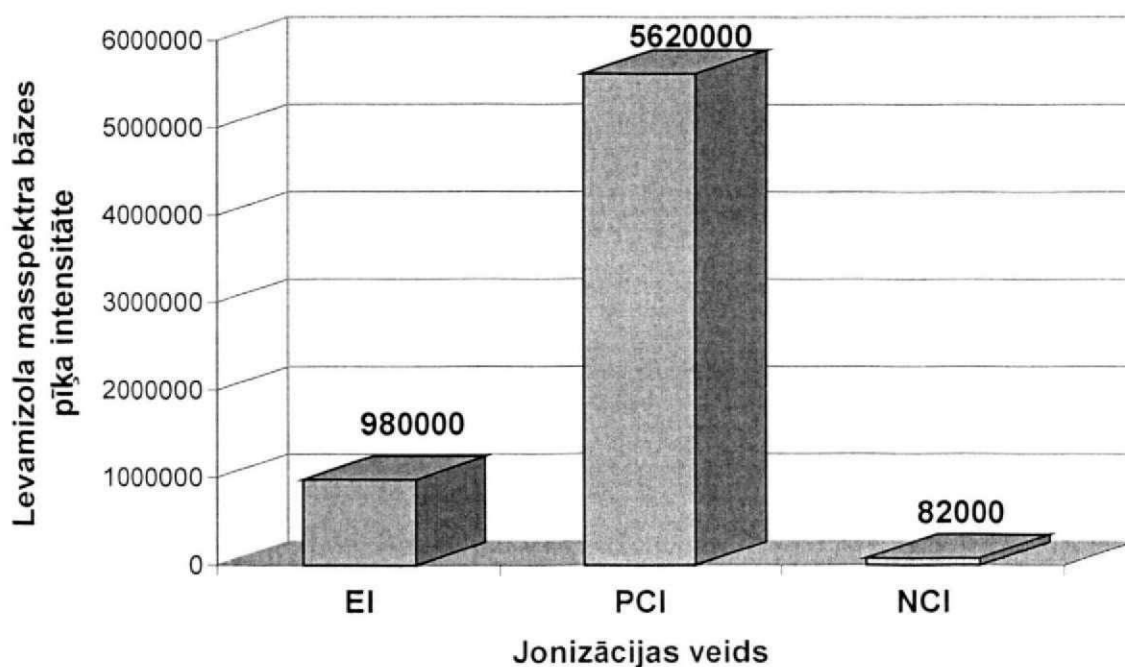
7.att. Jona 204 Da MS/MS fragmentācijas shēma.

Saišu C-N un C-S nestabilitātes dēļ notiek cikla atvēršana un CH₂=CH₂ atšķelšanās. Jons 178 Da ir bāzes smaile 205 Da šķembu jonu masspektā ES⁺ režīmā ar sadursmju enerģiju 22 eV. Atšķirībā no PĶJ jonizācijas, 127 Da jons ES⁺ jonizācijas režīmā pievieno divus protonus, veidojot jonu 129 Da.

Kā redzams no iegūtajiem rezultātiem, levamizola fragmentācijas shēmu stipri ietekmē jonizācijas veids un jonizācijas enerģija. Fragmentācija pārsvarā notiek 2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1b]tiazola heterociklā. Visintensīvākā fragmentācija ir raksturīga elektronu triecienu jonizācijai. Pozitīvās un negatīvās ķīmiskās jonizācijas spektriem ir raksturīgs stipri izteikts molekulārā jona signāls. Elektriskās izsmidzināšanas jonizācijas gadījumā masspektā bāzes smaile ir levamizola molekulārais jons un pārsvarā ir lielas molekulārās masas fragmenti, kas liecina par to, ka ES⁺ ir maiga jonizācijas metode.

3.1.2. Masspektrometra parametru optimizēšana levamizola noteikšanai.

Levamizola standartšķīdums ar koncentrāciju 1 mg/ml atkārtoti tika ievadīts gāzu hromatogrāfā ar masspektrometru, kas darbojas dažādos jonizācijas režīmos. Tika iegūti trīs masspektri, kas atbilst elektronu triecienu, pozitīvās un negatīvās ķīmiskās jonizācijas režīmiem. Par salīdzināšanas kritēriju tika izvēlēta masspektra bāzes smailes intensitāte. Rezultāti ir parādīti 8. att.

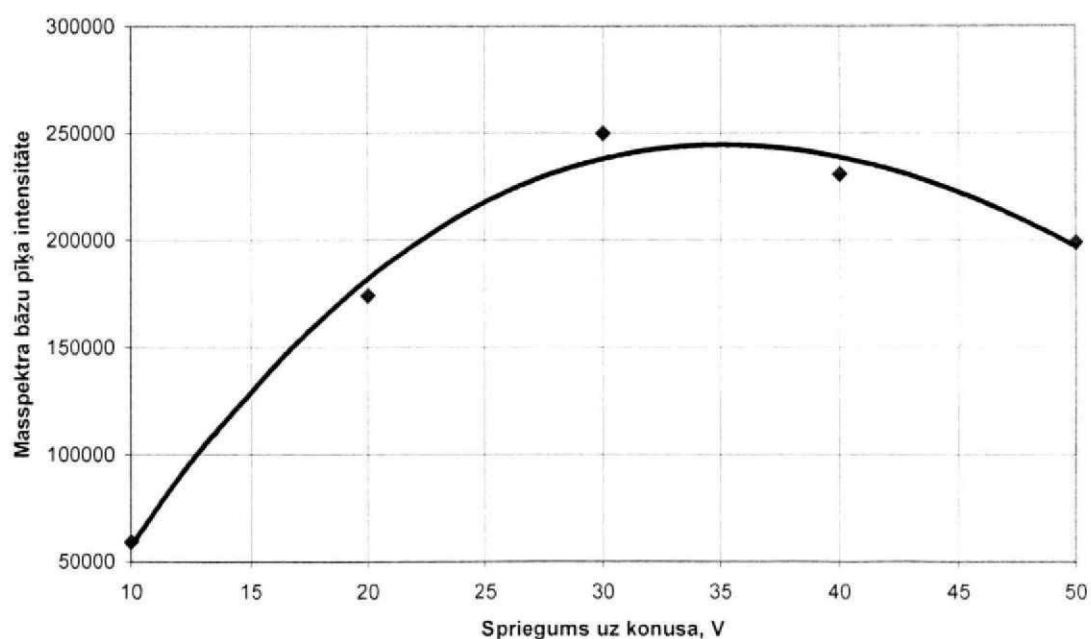


8.att. Levamizola masspektra bāzes līnijas intensitāte atkarībā no jonizācijas veida.

Masspektra bāzes līnijas intensitāte raksturo metodes jutību. No rezultātiem ir redzams, ka vislielākā analītiskā signāla intensitāte piemīt pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmam. Tas varētu būt izskaidrojams ar levamizola molekulas protonēšanas zemo enerģiju un līdz ar to lieliem iznākumiem CH₄ PĶJ procesā. Ļoti zema NĶJ analītiskā signāla intensitāte ir saistīta ar levamizola molekulā esošo atomu zemo elektrontieksmi.

No rezultātiem var izsecināt, ka levamizola noteikšanai vispiemērotākie ir elektronu triecienu vai pozitīvās ķīmiskās jonizācijas darbības režīmi. Optimālo metodes jutību var sasniegt tieši PĶJ režīmā.

AEŠH-MS-MS darbības optimizēšanā ļoti svarīgi ir izvēlēties potenciālu starpību uz konusa un sadursmju enerģiju, lai bāzes pīķa intensitāte un līdz ar to metodes jutība būtu maksimālā. Potenciālu starpība uz konusa ietekmē prekursora jona 205 Da veidošanos. Bāzes smailes m/z 205 Da atkarība no potenciāla starpības ir parādīta 9. att.



9.att. Levamizola masspektra bāzes smailes m/z 205 Da atkarība no potenciāla starpības uz AEŠH-MS-MS konusa.

Kā redzams no rezultātiem, potenciāla starpība uz konusa ļoti būtiski ietekmē levamizola jonizāciju. Levamizola molekulārā jona intensitāte sasniedz maksimālo vērtību, ja spriegums ir 35 V.

Sadursmju enerģija ietekmē procesu, kas notiek reakciju kamerā Q₂. Jons 205 Da sadursmju rezultātā ar argona molekulām fragmentējas, un analīzes jutības paaugstināšanas

nolūkā ir nepieciešams izvēlēties šķembu jonu ar vislielāko intensitāti. Lai paaugstinātu mērīšanas selektivitāti, racionāli ir izvēlēties šķembu jonu ar lielāku masu, jo tad fona ietekme ir vismazākā. Sadursmju enerģijas ietekme uz 205 Da jona fragmentāciju ir attēlota 10. pielikumā. Ir redzams, ka ar sadursmes enerģiju 5 eV fragmentācija nenotiek. Šķembu jona 178 Da intensitāte ir maksimālā pie argona molekulu enerģijas 25 eV, bet 45 elektronvoltos šis jons pilnīgi pārvēršas fragmentos ar zemāku masu. Uzņemot jona 178 Da intensitātes atkarību no sadursmju enerģijas intervālā 20-30 eV, analīzei izvēlēta sadursmju enerģija 22 eV.

3.1.3. Levamizola apstiprināšanas procedūra.

Identificējot savienojumu ar hromatogrāfiskām metodēm, par kritēriju visbiežāk izmanto aiztures laiku. Lai paaugstinātu analīzes drošību, var uzņemt analizējamā parauga hromatogrammu uz citas polaritātes kolonnas [52]. Šī metode prasa vairāku kolonnu izmantošanu un ir ļoti darbietilpīga. Masspektrometrijas metodes izmantošana ļauj vienkāršot apstiprināšanas procedūru.

Pastāv norādes uz levamizola klātbūtni, ja analizējamā paraugā hromatogrāfiskās smailes aiztures laiks ir $\pm 2s$ no levamizola standartvielas aiztures laika vai ir novērota 204 Da jona klātbūtne elektronu triecienu jonizācijas režīmā [11].

Lai apstiprinātu levamizola klātbūtni analizējamā paraugā, izpēta masspektrā jonu 121, 148, 203, 204 Da klātbūtni. Aprēķina to intensitāti attiecībā pret bāzes smaili m/z 148.

Elektronu triecienu jonizācijas mērīšanas rezultāti ir apkopoti 1. tabulā.

1.tabula

Levamizola masspektra dažādu jonu attiecība (vidēja no 10 mērījumiem) GH-MS EJ režīmā

Koncentrācija, ng/ μ l	Jons (m/z)			
	121	148	203	204
1	44 \pm 12	100	47 \pm 5	67 \pm 16
2	35 \pm 4	100	47 \pm 4	79 \pm 15
5	26 \pm 3	100	45 \pm 3	90 \pm 10

Rezultāti rāda, ka atkarībā no levamizola koncentrācijas, mainās arī jonu intensitātes attiecības. Šo parādību var izskaidrot ar fona ietekmi, kas ir lielāka zemām koncentrācijām. Nepieciešams pievērst uzmanību jonam 204 Da, kura intensitāte pieaug līdz ar koncentrāciju un lielās koncentrācijas šis jons kļūst par bāzes smaili. Jonu attiecības nenoteiktība samazinās pieaugot koncentrācijai.

Tātad levamizola apstiprināšanas procedūrā ar GH-MS EJ metodi ir jāņem vērā preparāta koncentrācija, t.i. nezināmā pīķa masspektu nepieciešams salīdzināt ar tuvākās koncentrācijas standartšķīduma masspektu.

GH-MS mērījumiem PĶJ režīmā izvēlas jonus 127, 204, 205, 206 Da. To attiecība pret bāzes pīķu 205 Da ir parādīta 2. tabulā.

2.tabula

Levamizola masspektra dažādu jonu attiecība GH-MS PĶJ režīmā (n=3)

Koncentrācija, ng/μl	Jons (Da)			
	127	204	205	206
0,5	4,9	4,6	100	13,0
1	3,4	3,8	100	14,9
1,5	4,5	4,2	100	13,4
2	3,3	3,7	100	15,4
2,5	4,2	4,2	100	13,6
3	4,6	4,4	100	12,5
3,5	4,4	4,3	100	12,7
4	4,3	4,3	100	12,6
4,5	3,9	4,0	100	13,6
5	4,0	4,2	100	12,9
Vidējā attiecība	4,1	4,2	100	13,5
Relatīvā standartnovirze, %	12	5,8	0	7,3

Rezultāti rāda, ka GH-MS mērījumiem ķīmiskās jonizācijas režīmā dažādu jonu attiecības atkarība no koncentrācijas ir krietni mazāka. To var izskaidrot ar mazāku fona ietekmi uz GH-MS PĶJ mērījumiem. Rezultātiem nav novērota tendence samazināties vai paaugstināties līdz ar koncentrācijas maiņu. Stabīlas jonu intensitātes attiecības ļauj droši veikt apstiprināšanas procedūras.

3.1.4. Metodes parametru pārbaude

Atkārtamības pārbaude.

Lai salīdzinātu gāzu hromatogrāfa - masspektrometra rezultātu atkārtamību EJ un PĶJ režīmā, levamizola standartšķīdumi ar koncentrāciju 1, 2 un 5 ng/μl atkārtoti (n=5) tika ievadīti hromatogrāfā. Rezultāti ir apkopoti 3. tabulā.

Levamisola GH-MS noteikšanas atkārtojamība EJ un PĶJ režīmos (n=5).

Levamisola koncentrācija, ng/μl	Relatīvās standartnovirzes hromatogrāfisko smaiļu augstumiem, %	
	EJ režīms	PĶJ režīms
1	11,1	5,4
2	12,5	3,2
5	15,1	7,3

No rezultātiem var izsecināt, ka gāzu hromatogrāfijas - masspektrometrijas metodei piemīt samērā liela izkliede starp paralēliem mērījumiem. Masspektrometrijā atkārtojamība galvenokārt ir atkarīga no jonizācijas procesu stabilitātes. Praktiski aparātu ražotājiem ir ļoti grūti nodrošināt stabilus jonizācijas apstākļus. Ļoti būtiska ir arī turbomolekulāro sūkņu darbība, kas nodrošina vakuumu jonizācijas kamerā.

Pozitīvās ķīmiskās jonizācijas labāka atkārtojamība, iespējams, ir saistīta ar šīs metodes augstāku jutību. Līdz ar to analītiskais signāls vienādām šķīduma koncentrācijām EJ režīmā ir tuvāk noteikšanas robežai, kur gadījuma novirzes ir lielākas.

Lai noteiktu AEŠH-MS-MS atkārtojamību, tika izmantots levamisola standartšķīdums ar koncentrāciju 5 ng/ml. Relatīvā standartnovirze 5 atkārtotiem mērījumiem (smaiļu platībām) ir 6,8%. Ņemot vērā ļoti zemu šķīdumu koncentrāciju, var izdarīt secinājumu par AEŠH-MS-MS mērījumu labāku atkārtojamību, salīdzinot ar GH-MS EJ režīmā.

Linearitātes pārbaude. Minimālā nosakāmā levamisola koncentrācija.

GH-MS EJ noteikšanas metodes linearitātes pārbaude veikta uzņemot hromatogrammas levamisola standartšķīdumiem ar koncentrāciju 1, 2, 5 un 10 ng/μl. Integrē hromatogrāfiskos smailes un konstruē graduēšanas grafiku smaiļu augstumiem pret šķīduma koncentrāciju.

Noteikšanas koeficients lineārai graduēšanas taisnei, kas iegūta ar GH-MS EJ metodi, ir $R^2=0,991$, kas ir pietiekami labs rādītājs, ņemot vērā metodes atkārtojamību.

GH-MS PĶJ metodei graduēšanas grafiku koncentrāciju intervālam 0,5-5,0 ng/μl vislabāk apraksta otrās kārtas polinoma vienādojums (noteikšanas koeficients ir $R^2=0,993$). Graduēšanas grafika nelineārais raksturs darba koncentrāciju diapazonā ir lielākais levamisola GH-MS PĶJ noteikšanas metodes trūkums. Bet problēma ir atrisināma veicot graduēšanu vairākiem punktiem un katru mērīšanas reizi pārbaudot līnijas stabilitāti [53]. Aprēķinus var

veikt izmantojot otrās kārtas polinoma analītisko vienādojumu vai izmantojot lineāro vienādojumu starp diviem tuvākiem graduēšanas grafika punktiem.

Nepieciešams atzīmēt, ka, graduēšanas grafika konstruēšanai, katrai koncentrācijai pīķa augstumus ir jāņem vismaz piecas reizes, lai izslēgtu lielas nejaušas novirzes. Graduēšanas grafiku ir jāņem katru reizi pēc masspektrometra autoregulēšanas (*autotune*), jo regulēšanas rezultātā var tikt izmainīts spriegums uz elektrodiem, tātad arī aparāta jutība.

AEŠH-MS-MS graduēšanas grafika konstruēšanai izmantoti standartšķīdumi ar koncentrācijām 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0 ng/ml. Graduēšanas taisne ir lineāra un noteikšanas koeficients ir $R^2=0,998$.

Nosakot minimāli nosakāmo levamizola koncentrāciju standartšķīdumā no attiecības signāls / troksnis = 3, iegūst šādus rezultātus: GH-MS EJ režīmā -140 ng/ml, GH-MS PĶJ režīmā - 8,9 ng/ml, AEŠH-MS-MS - 0,19 ng/ml.

Pārrēķinot šo koncentrāciju uz levamizola saturu aknās, ja noteikšanu veic atbilstoši 2.nodaļas metodei, iegūst šādas metodes jutības: GH-MS EJ - 1,9 µg/kg, GH-MS PĶJ - 0,12 µg/kg, AEŠH-MS-MS - 0,0025 µg/kg. Literatūrā līdz šim ir aprakstītas minimālās noteikšanas robežas - 20 µg/kg piena ar šķidrums hromatogrāfijas metodi [10], 5 µg/kg aknu ar GH-MS EJ metodi [11], 1 µg/kg piena ar GH slāpekļa - fosfora selektīvo detektoru [15, 54]. Šķidrums hromatogrāfijas ar UV detektoru jutība levamizola standartšķīdumam ir 170 µg/ml [55].

Atgūstamība, atkārtojamība un reproducējamība

Loti svarīgs analītiskās metodes raksturlielums ir atgūstamība, kas rāda standartvielas ekstrahēšanas pakāpi, un metodes precizitāte, ko izsaka ar atkārtojamību un reproducējamību. Lai noteiktu metodes parametrus pārbaudi levamizols tika pievienots matricai (aknām) trīs dažādos līmeņos (0,5, 1 un 1,5 reizes no maksimāli pieļaujamās levamizola koncentrācijas) un analizēts ar GH-MS metodi trīs dažādās dienās pa sešiem paralēliem atkārtojumiem. Rezultāti aprēķināti, izmantojot deiterēto levamizola iekšējo standartu. Rezultāti ir apkopoti 4.tabulā.

Levamisola GH-MS noteikšanas atgūstamība un atkārtojamība (n=6)

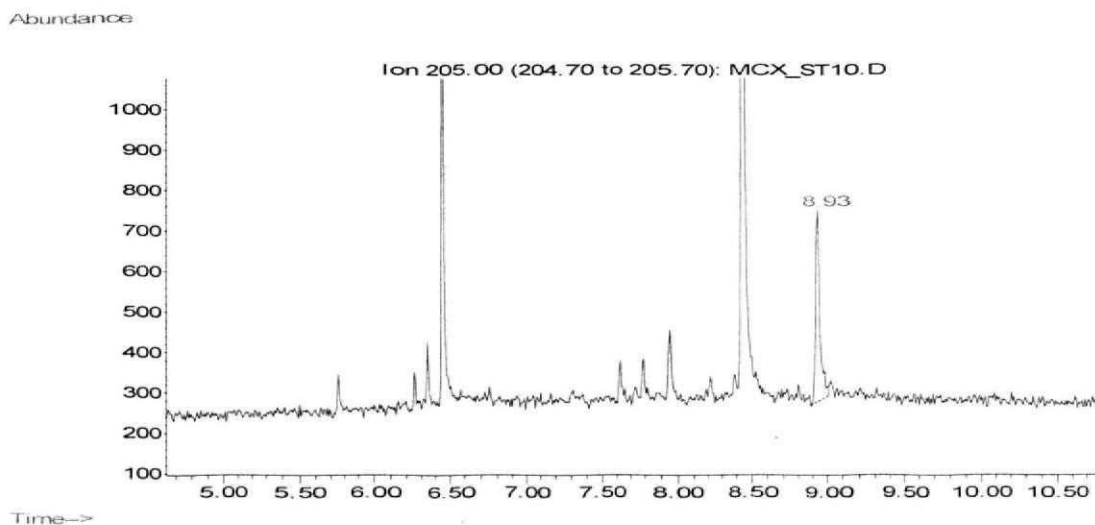
Levamisola standartpiedevas koncentrācija	1.diena		2.diena		3.diena	
	Noteiktā koncentrācija, $\mu\text{g/kg}$	Atkārtojamība, %	Noteiktā koncentrācija, $\mu\text{g/kg}$	Atkārtojamība, %	Noteiktā koncentrācija, $\mu\text{g/kg}$	Atkārtojamība, %
50	52,5	5,4	46,5	7,8	41,1	7,3
100	112	4,5	82	13	97	4,8
150	143	6,7	150	5,3	141	2,8

Levamisola vidējā (n=18) atgūstamība standartpidevai ar koncentrāciju 50 $\mu\text{g/kg}$ ir 93%, koncentrācijā 100 $\mu\text{g/kg}$ – 97% un koncentrācijā 150 $\mu\text{g/kg}$ – 96%, kas apmierina prasības pret analītiskām metodēm, saskaņā ar kurām metodes atgūstamībai (standartpiedevas koncentrāciju diapazonā > 10 $\mu\text{g/kg}$) jābūt > 80% [48].

3.1.5. Levamisola paraugu sagatavošanas metožu izstrāde. Fentanila atlieku noteikšana

Lai izstrādātu paraugu sagatavošanas metodi, kas būtu pielietojama pēc iespējas lielākam savienojumu skaitam, šajā pētījumā pārbaudītas universālās metodes: gelfiltrācijas hromatogrāfija un cietās fāzes ekstrakcija.

Cietās fāzes ekstrakcija ar *Oasis MCX* kolonnā ir pielietojama bāzisko savienojumu noteikšanai, jo šajā kolonnā ir sorbents ar apgrieztās fāzes un katjonu apmaiņas funkcionālām grupām. Šajā darbā ir pārbaudīta iespēja izmantot šīs kolonnas levamisola noteikšanai. Tika konstatēts, ka levamisola absolūtā desorbējamība uz *Oasis MCX* kolonnas ir 71% un mērījumu atkārtojamība ir 10% (n=3). Metodei ir raksturīgs neliels reaģentu patēriņš, tā ir ātra un ērta izmantošanā, salīdzinot ar šķidrums-šķidrums ekstrakciju. Pateicoties sorbenta selektīvām īpašībām, *Oasis MCX* kolonnas efektīvi attīra paraugu no traucējošām vielām (10.att.)



10.att. Aknu parauga ar levamizola standartpiedevu 10 ng/g pēc attīrīšanas ar Oasis MCX kolonnu GH-MS hromatogramma.

Cietās fāzes ekstrakcija ar Oasis MCX kolonnu tika pielietota arī fentanila atlieku noteikšanai [6]. Analīzes metode ir izmantota dažādu fentanila farmakokinētikas parametru noteikšanai putnos. Metodes ir selektīva, jutīga (noteikšanas robeža ir 0,05 ng/ml) un lineāra standartpiedevu diapazonā 0,2 – 150 ng/ml ($R^2 = 0,999$).

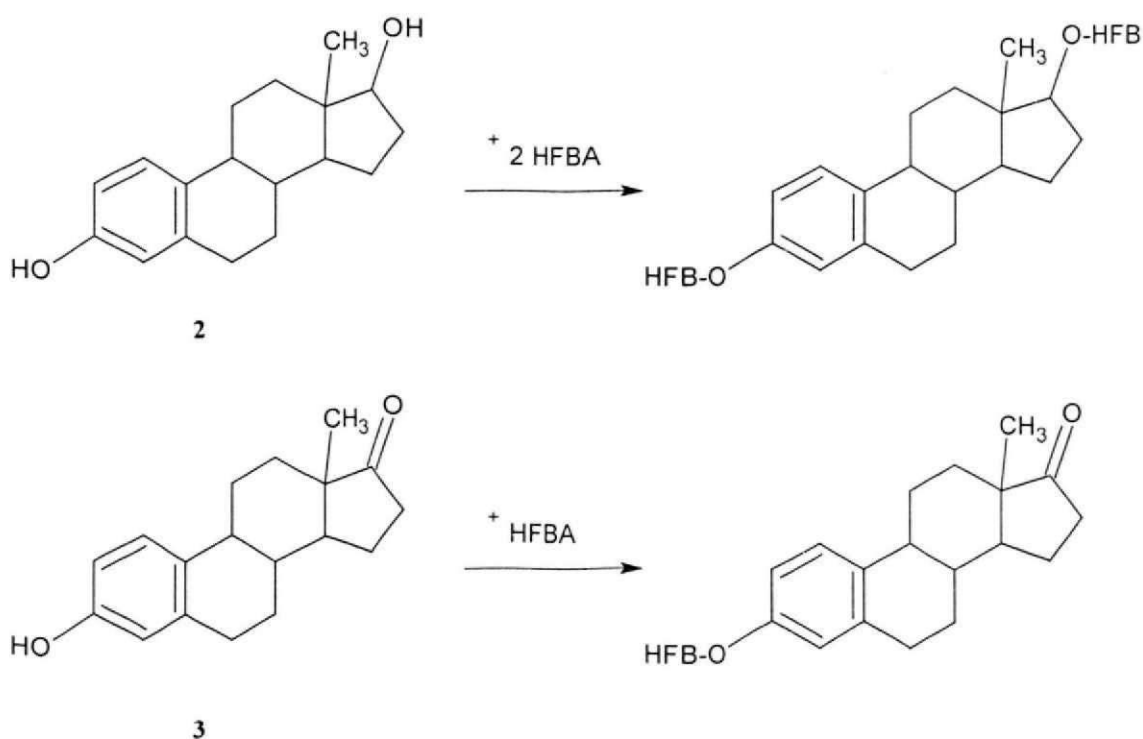
3.1.6. Levamizols dzīvnieku izcelsmes produkcijā

Valsts veterināro zāļu atliekumdaudzuma kontroles programmas ietvaros levamizols tika noteikts 90 gaļas un 300 piena paraugos no dažādām Latvijas kautuvēm un fermām. Paraugi tika uzglabāti -18°C temperatūrā. Levamizola klātbūtne tika konstatēta septiņos paraugos - cūku un liellopu aknās. Pārējos paraugos levamizola saturs bija zem minimālās nosakāmās koncentrācijas. Vislielākā novērotā levamizola koncentrācija ir 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Šī koncentrācija ir mazāka nekā maksimāli pieļaujama levamizola saturs produktos, kas noteikts Eiropas Savienības valstīs (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). No pētījuma rezultātiem var secināt, ka, tā kā levamizolu plaši pielieto Latvijā, ir nepieciešams turpināt šī veterināra preparāta satura kontroli dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos.

3.2. Hormonālo savienojumu atlieku noteikšanas metode

3.2.1. Derivatizācija un masspektrometriskās fragmentācijas veidi

Šajā darbā tika veikta hormonālo savienojumu derivatizācija ar heptafluorosviestskābes (HFBA) anhidrīdu un reakcijas produktus analīze ar gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodi elektronu triecienu, negatīvās un pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmos. Rezultāti rāda, ka visus savienojumus var iedalīt divās grupās – vielas, kas reaģē ar vienu vai divām HFBA molekulām. Kā piemēru var minēt estradiolu **2** un estronu **3**.



11.att. Estriola un estrona derivatizācijas shēmas.

Tabula Nr.5 paskaidro atšķirību starp divām grupām, veicot savienojumu analīzi ar masspektrometrijas metodi.

Hormonālo preparātu derivatizācijas produktu noteikšanas jutība GH-MS PĶJ un NĶJ režīmā.

Savienojuma nosaukums	100 ng/μl šķīduma smailes augstums		Smaiļu augstuma attiecība PĶJ un NĶJ režīmos	HFB grupu skaits derivatizācijas produktā
	PĶJ režīmā	NĶJ režīmā		
Estrons	133353	8045	17	1
Androstendions	70768	6483	11	1
Androsterons	199858	14961	14	1
17-metiltestosterons	89716	1301	69	1
Vidējā attiecība savienojumiem saturošiem 1 HFB grupu			28	
Dietilstilbestrols	65457	285605	0.23	2
Boldenons	309362	230469	1.3	2
Estriols	217914	263342	0.83	2
Heksestriols	153497	44462	3.5	2
21-Hidroksiprogesterons	15250	82419	0.19	2
Vidējā attiecība savienojumiem saturošiem 2 HFB grupas			1,2	

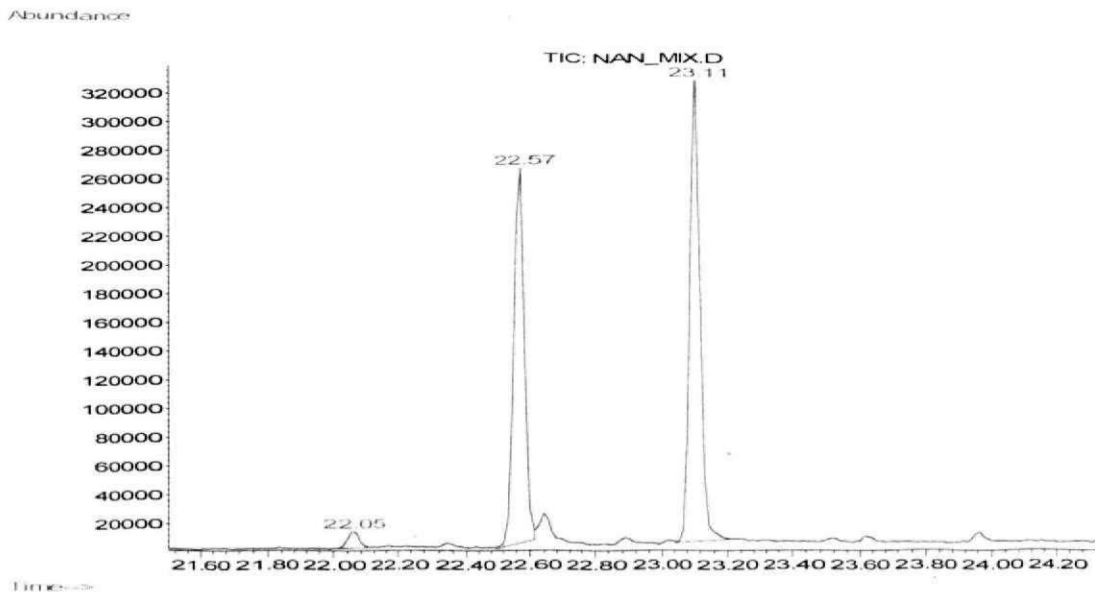
No rezultātiem var secināt, ka negatīvās ķīmiskās jonizācijas režīms nav jutīgs pret savienojumiem, kas pievieno tikai vienu heptafluorsviestskābes molekulu. Šajā gadījumā ir ieteicams izmantot pozitīvo ķīmisko jonizāciju vai elektronu triecienu jonizāciju. Savienojumiem, kas var pievienot divas HFB molekulas, ir ieteicama negatīvās ķīmiskās jonizācijas izmantošana sakarā ar šī režīma augsto selektivitātes un jutības līmeni.

Pamatojoties uz derivatizācijas produktu masspektriem, tika izvēlēti apstākļi gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas analīzes veikšanai izvēlēto jonu skanēšanas režīmā. Dati ir apkopoti 6. tabulā:

Jonu izvēle hormonālo savienojumu analīzei ar GH-MS pēc derivatizācijas ar HFBA

Savienojums	Joni EJ režīmā	Joni PĶJ režīmā	Joni NĶJ režīmā
Dienoestrols	445; 658	-	442; 461
Heksestrols	331; 303	-	446; 465
Dietilstilbestrols	660; 631	-	444; 463
17 α -Metiltestosterons	465; 480	461; 479; 481; 521	-
Zeranols	696; 625	-	499; 674; 694; 713
Boldenons	678; 464	-	462; 462; 658; 678
Nandrolons	666; 453	-	430; 450; 469; 646
Androsterons	486; 442	469; 487; 255; 273	
Testosterons	680; 467	-	444; 464; 483; 660
17 β -Estradiols	664; 409	-	427; 624; 644; 645
Estriols	663; 449	-	446; 639; 679; 710
Androstendions	482; 449	445; 465; 483; 511	-
Estrons	466; 422	449; 467; 495; 507	-
Progesterons	510; 467	467; 493; 511; 539	-
21-Hidroksiproģesterons	722; 707	-	525; 702; 703; 704
Megestrola acetāts	477; 580	-	738; 758
Medroksiproģesterona acetāts	479; 582	-	740; 760

Izstrādājot analītisko metodi, tika pārbaudīta arī hormonālo savienojumu derivatizācija ar pentafluoropropionskābes anhidrīdu (PFPA). Rezultāti liecina, ka derivatizācijas reakcijā ar PFPA veidojas reakcijas produkti, kas dod zemāku GH-MS signālu, salīdzinājumā ar produktiem reakcijā ar HFBA. Bez tam HFBA derivatizācijas produktiem ir lielāki aiztures laiki un lielākas raksturīgo jonu masas (50 masas vienības uz vienu HFB grupu), tādējādi ievērojami uzlabojas noteikšanas selektivitāte. 3.9. attēls parāda nandrolona hromatogrammu pēc derivatizācijas ar HFBA un PFPA maisījumu (1:1). Smaile ar aiztures laiku 23,11 min ir nandrolons ar divām HFB molekulām, smaile ar aiztures laiku 22,57 min ir nandrolona atvasinājums ar 1 HFB un 1 PFP grupu, bet smaile ar aiztures laiku 22,05 min ir nandrolona atvasinājums ar divām PFP grupām. Tālāka metodes izstrādāšana tika veikta, izmantojot tikai derivatizāciju ar HFBA.



12.att. GH-MS hromatogramma NĶJ režīmā nandrolona derivatizācijas reakcijas (HFBA+PFPA) produktiem.

3.2.2. Noteikšanas metodes parametru pārbaude

Linearitāte.

Lai novērtētu izstrādātās noteikšanas metodes kvalitāti, tika noteikti galvenie metodes raksturlielumi (linearitāte, atkārtojamība, atgūstamība un noteikšanas robeža) 11 hormonāliem savienojumiem. Detektēšanas sistēmas linearitāte tika pārbaudīta, izmantojot standartšķīdumus ar 5 dažādām koncentrācijām. Pēc savienojumu derivatizācijas ar HFBA un GH-MS mērījumiem tika konstruēts graduēšanas grafiks. Rezultāti liecina, ka metodei piemīt laba korelācija starp GH-MS signālu un hormonālo savienojumu koncentrāciju (R^2 ir intervālā no 0,993 dietilstilbestrolam līdz 1,000 megestrola acetātam). Negatīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā graduēšanas grafikus labāk apraksta otrās kārtas polinoma vienādojums.

Reproducējamība

Hormonālo savienojumu metodes validācijai tika izvēlēti deviņi savienojumi, kas pārstāv trīs preparātu grupas (stilbēni, steroīdi un rezorcinskābes laktoni) ar dažādām ķīmiskām īpašībām. Pārbaudei katrs savienojums tika pievienots matricai trīs dažādos līmeņos un analizēts trīs dažādās dienās pa sešiem paralēliem atkārtojumiem. Rezultāti iegūti, izmantojot attiecīgās savienojumu grupas iekšējo standartu. Tabulās 7 - 9 atspoguļoti vidējie rezultāti (izteikti ar relatīvo standartnovirzi) no visām 54 analīzēm.

Atgūstamība

Parametra pārbaudei tika salīdzināta piedevas aprēķinātā koncentrācija ar kalibrēšanas grafikiem, kas iegūti, izmantojot savienojumu standartšķīdumus. Dati par hormonālo savienojumu atgūstamību apkopoti 7. - 9. tabulās.

7. tabula

Stilbēnu noteikšanas metodes reproducējamība un atgūstamība

Savienojums	Iekšējais standarts	Standatpiedevas koncentrācija, µg/kg	Reproducējamība, %	Atgūstamība, %
DEN	DES-d6	0,9	8,9	98
		4,5	6,5	119
		18,0	8,0	125
DES		0,3	9,0	98
		1,5	7,2	98
		6,0	9,9	108
HEX		0,08	9,4	131
		0,4	8,3	119
		1,6	10,1	111

8. tabula

Zeranola un taleranola noteikšanas metodes reproducējamība un atgūstamība

Savienojums	Iekšējais standarts	Standatpiedevas koncentrācija, µg/kg	Reproducējamība, %	Atgūstamība, %
Zeranolis	Zeranolis-d4	0,4	17,0	118
		2,0	12,5	106
		4,0	12,6	92
Taleranolis	Taleranolis-d4	0,4	17,0	103
		2,0	16,6	97
		4,0	6,1	97

9. tabula

Steroīdu noteikšanas metodes reproducējamība un atgūstamība

Savienojums	Iekšējais standarts	Standatpiedevas koncentrācija, µg/kg	Reproducējamība, %	Atgūstamība, %
Boldenons	Testosterons -d2	3,0	9,1	104
		12,0	12,3	103
17β-Estradiols		2,0	14,7	146
		8,0	14,0	101
Testosterons		2,0	24,7	115
		8,0	8,2	87
Nandrolons		3,0	15,1	130
		12,0	10,2	123

Plašu atgūstamības intervālu (no 92% līdz 146%) var paskaidrot ar diviem faktoriem:

- 1) analizējamo savienojumu zudumi paraugu sagatavošanas procesā;
- 2) matricas efekts, kas pastiprina savienojumu analītisko signālu.

3.3. Sulfanilamīdu un nitroimidazolu atlieku noteikšanas metode

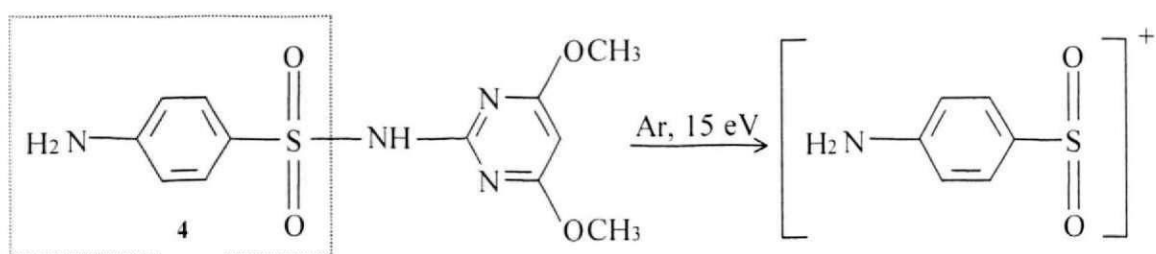
3.3.1. Savienojumu fragmentācija, AEŠH-MS-MS apstākļu izvēle

Lai izvēlētos analīžu apstākļus

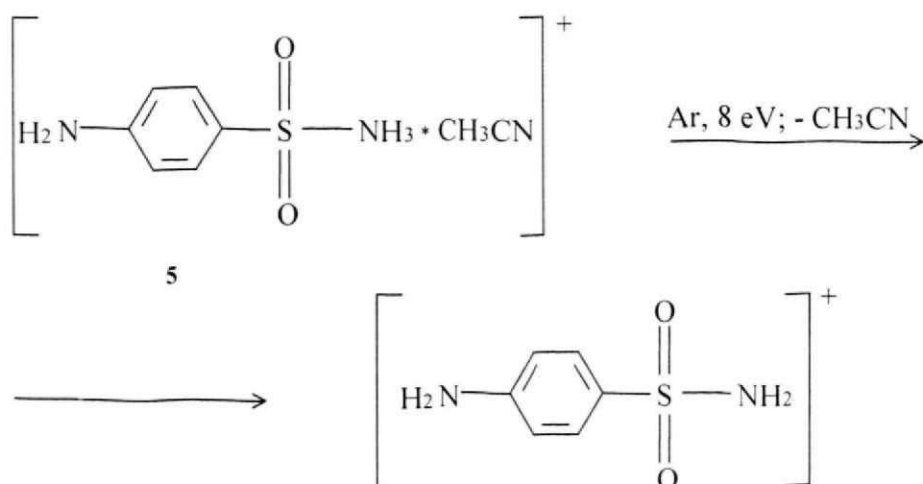
- tika uzņemti sulfanilamīdu un nitroimidazolu standartvielu masspektri,
- analīzei izvēlēts molekulārais jons un veikta to fragmentācija,
- no šķembu joniem izvēlēts fragments (jons) ar lielāko intensitāti (izņemot sulfanilamīdu).

Iespējamās fragmentācijas ir šādas:

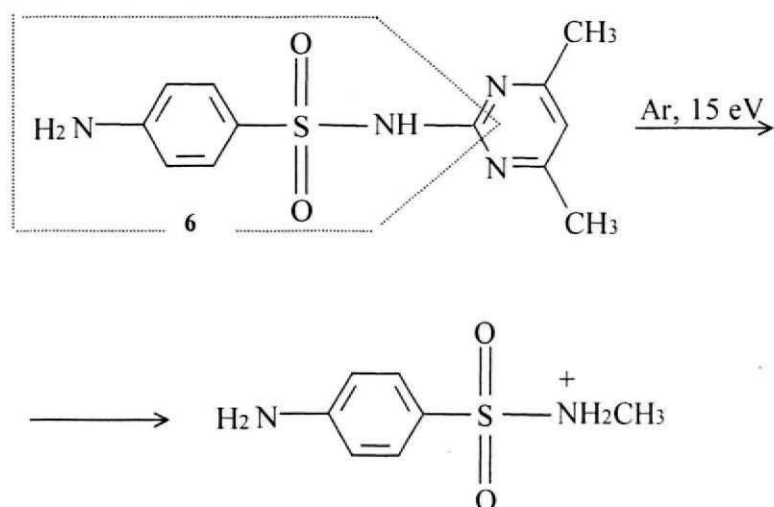
sulfadimetoksīnam **4**, sulfahlorpiridazolam, sulfametizolam un sulfatiazolam ir līdzīga fragmentācija:



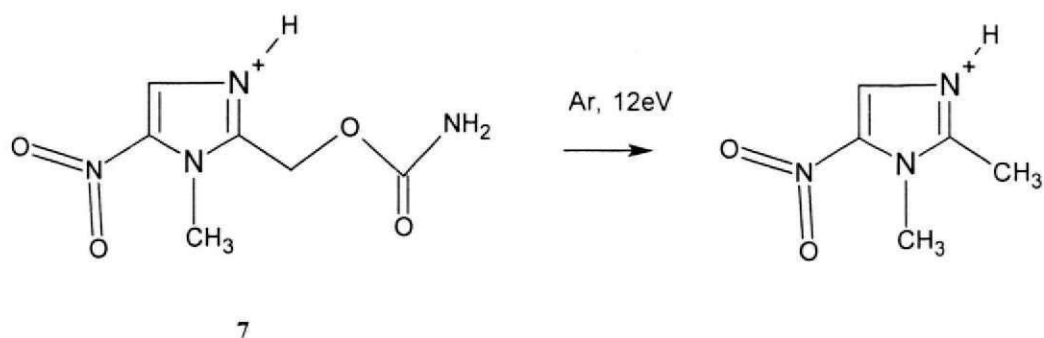
Sulfanilamīds **5** veido aduktu:



Sulfadimidīns **6** fragmentējas sekojoši:



Nitroimidazola grupas savienojuma (ronidazols **7**) fragmentācija realizējas sekojoši:



3.3.4. Noteikšanas metodes parametru pārbaude.

Sulfanilamīdu un trimetoprīma detektēšanas linearitāte

Lai veiktu veterināro zāļu atlieku kvantitatīvo noteikšanu, ir nepieciešams pārbaudīt attiecīgu graduēšanas grafiku linearitāti. Tika pagatavoti sulfanilamīdu un trimetoprīma standartšķīdumi ar koncentrācijām 10, 5, 1, 0,5 un 0,1 ng/μl un uzņemtas hromatogrammas. Pēc graduēšanas grafiku konstruēšanas aprēķina taisnes vienādojumus un noteikšanas koeficientus.

Sulfanilamīdu detektēšanas linearitāte

Nosaukums	Standartšķīdumu koncentrācija, ng/μl					Taisnes vienādojums	Noteikšanas koeficients R ²
	10	5	1	0,5	0,1		
	Smailes laukums						
Sulfadimetoksīns	5935	2279	365	210	42	y= 588,92x-189,01	0,987
Trimetoprimis	4901	2354	545	371	197	y= 474,34x+ 98,79	0,999
Sulfahlorpiridazīns	16971	8006	1165	673	118	y= 1712,4x-298,66	0,999
Sulfadimidīns	10875	4702	719	363	77	y= 1090,7x-274,09	0,996
Sulfametizols	16986	6912	1017	377	76	y= 1706,5x-591,85	0,992
Sulfatiazols	27233	11116	1818	687	153	y= 2725,9x-848,65	0,993
Sulfanilamīds	30812	13961	2642	1441	291	y = 3066,1x-350,13	0,998

No iegūtiem datiem var secināt, ka gandrīz visiem sulfanilamīdiem ir laba linearitāte, jo noteikšanas koeficienti svārstās no 0,987 līdz 0,999. Nedaudz sliktāka linearitāte ir sulfadimetoksīnam ($R^2 = 0,987$) un sulfametizolam ($R^2 = 0,992$).

Veicot savienojumu graduēšanu uz matricas (izmantojot standartpiedevas 20, 50, 80 un 100 μg/kg) tika iegūtas šādi graduēšanas grafiku noteikšanas koeficienti:

sulfadimetoksīns	$R^2 = 0,996$
trimetoprimis	$R^2 = 0,995$
sulfahlorpiridazīns	$R^2 = 0,997$
sulfadimidīns	$R^2 = 0,994$
sulfametizols	$R^2 = 0,999$
sulfatiazols	$R^2 = 0,996$
ronidazols	$R^2 = 0,999$
metronidazols	$R^2 = 0,994$

Līdz ar to sulfanilamīdu un nitroimidazolu šķīduma hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas noteikšanas metodei ir novērojama laba korelācija starp šķīdumu koncentrāciju un masspektrometra analītisko signālu.

Noteikšanas robežkoncentrācija

Saskaņā ar Latvijas likumdošanu, sulfanilamīdu atlieku daudzums dzīvnieku audos nedrīkst pārsniegt 100 µg/kg. Noteikšanas robežas tika aprēķinātas standartšķīdumam (c=0,5 ng/µl) un paraugam ar piedevu 100 µg/kg.

11. tabula

Savienojumu noteikšanas robeža

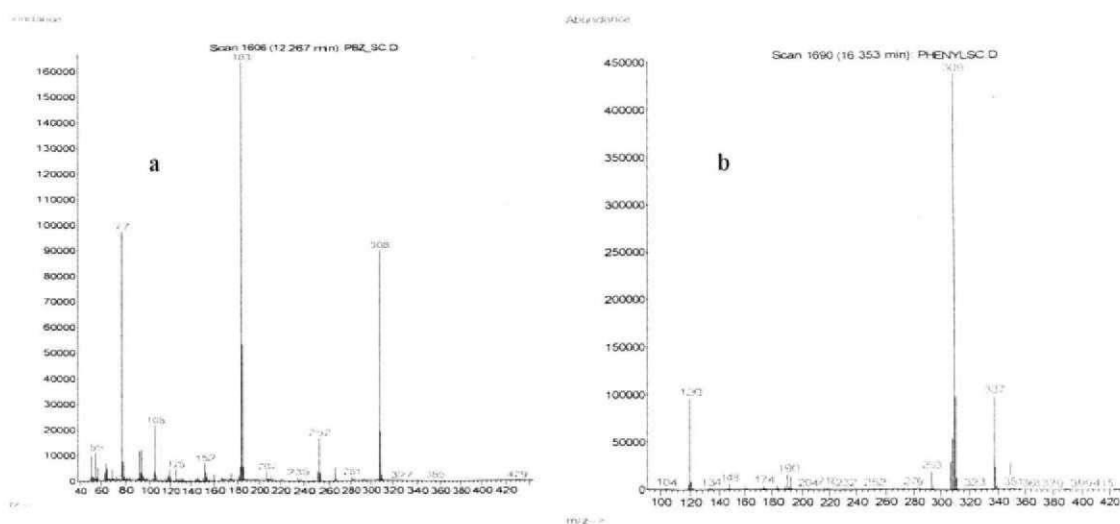
Nosaukums	Standartšķīdumā			Paugā	
	Konc., ng/µl	Signāls/ troksnis, S/N	Noteikš. robeža, ng/µl	Signāls/ troksnis, S/N (100 µg/kg)	Noteikš. robeža, µg/kg
Sulfa- dimetoksīns	0,5	10,1	0,15	18,9	16
Trimetoprimis	0,5	30,8	0,05	38	8
Sulfahlor- piridazīns	0,5	26,7	0,06	92	3
Sulfadimidīns	0,5	57,5	0,03	100	3
Sulfametizols	0,5	25,0	0,06	77	4
Sulfatiazols	0,5	15,8	0,09	128	2
Sulfanilamīds	0,5	16,4	0,09	29,5	10
Ronidazols	-	-	-	53 (50µg/kg)	3
Metronidazols	-	-	-	41 (50µg/kg)	4
Vidējā noteikšanas robeža, µg/kg					7

No rezultātiem var secināt, ka izstrādātā paraugu sagatavošanas metode ir jutīga pret visiem darbā izmantotajiem sulfanilamīdiem, trimetoprimu un nitroimidazoliem.

3.4. Nesteroīdo pretiekaisuma preparātu atlieku noteikšanas metode

3.4.1. Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu fragmentācija dažādos jonizācijas režīmos

Izstrādājot nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu atlieku noteikšanas metodi, tika uzņemti savienojumu masspektri dažādos jonizācijas režīmos. Mērījumi PĶJ režīmā parādīja, ka šajā režīmā ir novērojama neliela savienojumu molekulu fragmentācija un pārsvarā veidojas mekulārais jons un brīvu radikāļu apvienošanās produkti $[M+C_2H_5]^+$ un $[M+C_3H_5]^+$. Molekulu fragmentācija ir izteiktāka EJ režīmā. Fenilbutazona masspektri elektronu triecienu un pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmos ir parādīti 13. attēlā.



13.att. (a) Fenilbutazona masspektrs, kas iegūts no standartšķīduma ar GH-MS EJ režīmā. (b) Fenilbutazona masspektrs, kas iegūts no standartšķīduma ar GH-MS PĶJ režīmā.

GH-MS mērījumi rezultāti un jonu izvēle nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu noteikšanai ir apkopota 12.tabulā.

12.tabula

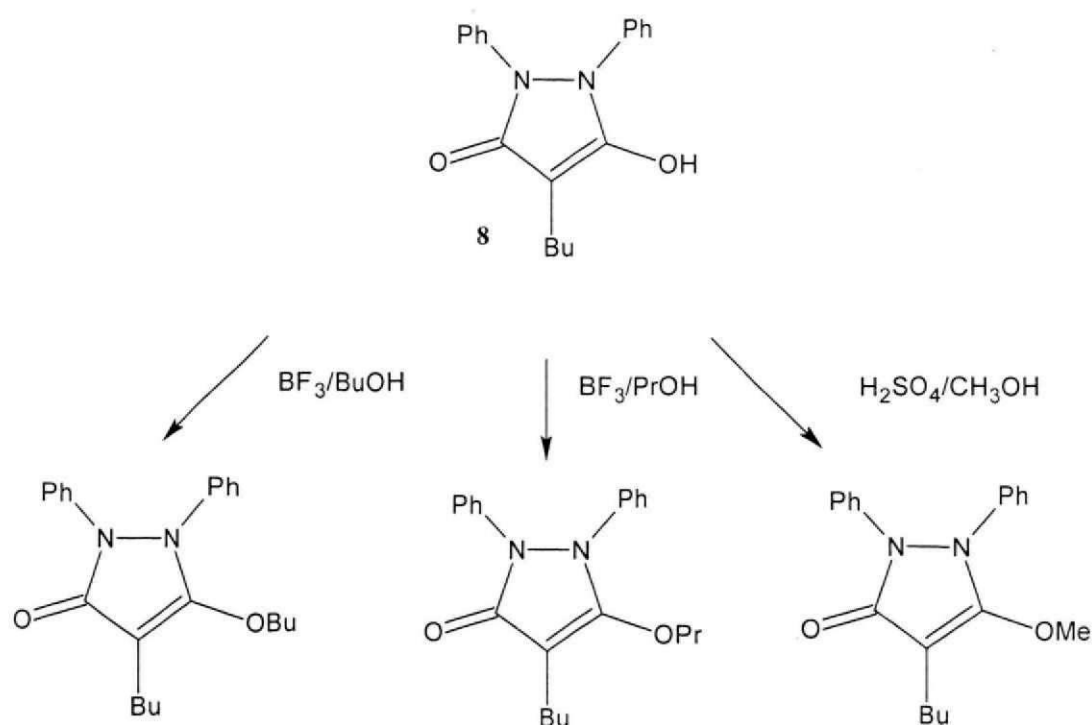
Jonu izvēle nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu noteikšanai ar GH-MS metodi

Savienojuma nosaukums	Savienojumu metilatvasinājuma joni GH-MS PĶJ režīmā	Savienojumu metilatvasinājuma joni GH-MS EJ režīmā
Fenoprofēns	197, 225, 257	197, 256, 198
Naproksēns	185, 245, 273	185, 244, 170
Ketoprofēns	269, 297, 309	209, 191, 268
Diklofenaks	278, 310, 250	214, 242, 309
Fenilbutazons	323, 351, 367	279, 309, 183

3.4.2. Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu derivatizācijas reakcijas

Šajā pētījumā ir pārbaudīta iespēja veikt vienlaicīgu fenilbutazona un citu nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu (ketoprofēns, naproksēns, fenoprofēns, diklofenaks) noteikšanu. Šiem savienojumiem piemīt organisko skābju īpašības un pirms analīzes ar gāzu hromatogrāfijas metodi ir nepieciešams veikt derivatizāciju. Eksperimentos ir pārbaudīta siliļēšanas reakcija ar BSTFA, metilēšanas reakcija ar metanola – sērskābēs šķīdumu, propilēšanas reakcija ar BF_3 / $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ šķīdumu un butilēšanas reakcija ar BF_3 / $\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ šķīdumu.

Iespējamie reakcijas mehānismi ir parādīti 14. attēlā.



14. att. Fenilbutazona **8** derivatizācijas reakcijas mehānismi, izmantojot dažādus reaģentus

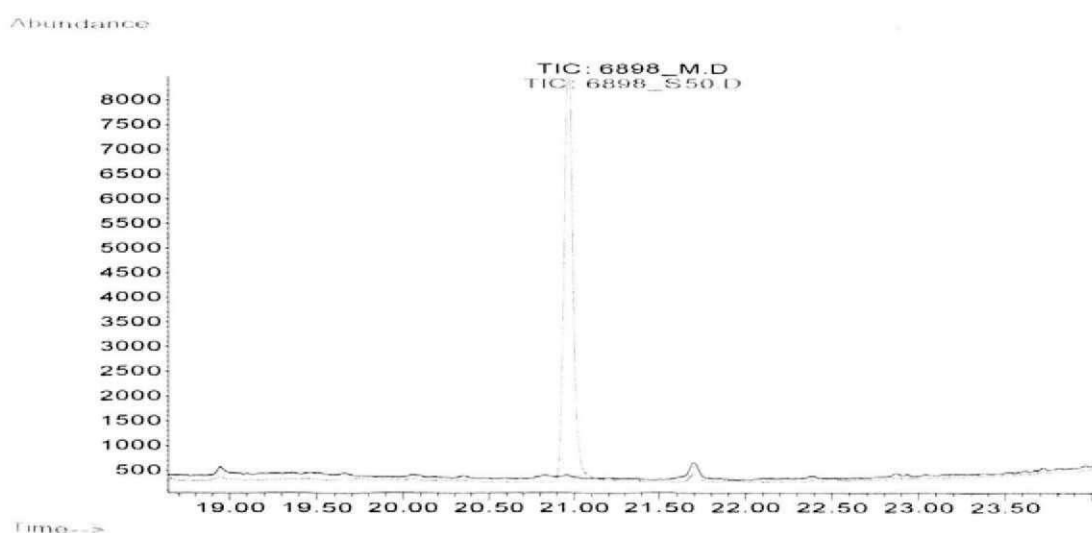
Eksperimentu rezultāti parāda, ka fenilbutazons nereaģē ar siliļējošo reaģentu (BSTFA). Metilēšanas reakcijas produktu gāzhromatogrāfiska analīze liecina par nemainītā un metilētā fenilbutazona klātbūtni. Hromatogrāfisko smaiļu laukumu attiecība Me-PBZ / PBZ ir 1,7. Smaiļu laukumu attiecība fenilbutazona propilatvasinājumam un fenilbutazonam ir 0,38 un fenilbutazona butilatvasinājumam un fenilbutazonam ir 0,27. Rezultāti rāda, ka derivatizācijas reakcijas iznākums samazinās līdz ar alkilgrupas masas pieaugumu. Var minēt, ka propilēšanas un butilēšanas reakcijas zemo iznākumu galvenokārt nosaka stēriskie faktori.

Salīdzinot dažādu metilēšanas reagentu pielietojšanas efektivitāti, turpmākiem pētījumiem tika izmantots trimetilsilildiazometāna šķīdums heksānā.

3.4.3. Paraugu sagatavošanas metodes izstrāde. Metodes selektivitāte.

Izstrādātā paraugu sagatavošanas metode pamatojas uz to, ka fenilbutazona sadalīšanās konstante starp organisko un ūdens fāzi dažādos pH vērtībās būtiski atšķiras. Šajā eksperimentā tika pārbaudīti heksāns, etilacetāts un dihlorometāns. Analīzes parādīja, ka heksāns ir piemērotākais šķīdinātājs traucējošo vielu ekstrakcijai no sārmainā ūdens šķīduma, bet dihlorometāns ir labākais šķīdinātājs fenilbutazona ekstrakcijai no paskābinātas ūdens fāzes. Izstrādātās metodes apraksts ir sniegts 2.3. nodaļā.

Metodes selektivitāte tika pārbaudīta, analizējot dažādus tukšos gaļas un piena paraugus. Šo paraugu hromatogrammas nesatur smailes, kas pārklājas ar nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu smailēm. Fenilbutazona noteikšanas metodes selektivitāte ir parādīta 15. attēlā.



15.att. Gaļas parauga hromatogramma bez fenilbutazona piedevas kopā ar standartpiedevas hromatogrammu. Fenilbutazona standartpiedevas koncentrācija ir 50 µg/kg.

3.4.4. Metodes linearitāte un jutība

GH-MS mērījumi fenilbutazona standartšķīdumiem ar koncentrācijām 10 – 1000 ng/ml uzrāda labu korelāciju starp smaīļu augstumiem un fenilbutazona koncentrāciju ($R^2 = 0,998$). Fenilbutazona noteikšanas robeža standartšķīdumos elektronu triecienu jonizācijas režīmā ir 10 ng/ml (aprēķināts, ņemot vērā signāls / troksnis attiecību no fenilbutazona standartšķīduma ar koncentrāciju 20 ng/ml). GH-MS mērījumi pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā parādīja,

ka analīzei ir raksturīga piecas reizes zemāka jutība un līdz ar to metožu kvalitātes parametru pārbaudei ir izmantots tikai elektronu triecienu jonizācijas režīms.

Graduēšana uz matricas uzrādīja labu linearitāti paraugiem ar nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu piedevā koncentrāciju diapazonā 10 – 100 µg/kg ($R^2 = 0,998$ (diklofenaks), $R^2 = 0,998$ (fenoprofēns), $R^2 = 0,999$ (naproksēns), $R^2 = 0,989$ (ketoprofēns), $R^2 = 0,998$ (fenilbutazons)).

Nesteroīdu pretiekaisuma līdzekļu noteikšanas metodes atgūstamība un atkārtojamība tika pārbaudīta, trīs dažādās dienās analizējot sešus paraugus ar standartpiedevu koncentrācijām 5, 10 un 25 µg/kg. Validācijas rezultāti ir apkopoti 13. tabulā.

13. tabula

Nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu atlieku noteikšanas metodes reproducējamība un atgūstamība

Savienojums	Standartpiedevas koncentrācija, µg/kg	Noteiktā koncentrācija, µg/kg	Reproducējamība, %
Fenoprofēns	5	3,9	27
	10	8,5	20
	25	29,1	5,6
Naproksēns	5	3,9	28
	10	8,1	20
	25	27,3	6,0
Ketoprofēns	5	3,9	25
	10	8,0	21
	25	25,1	12,8
Diklofenaks	5	4,4	12
	10	7,4	20
	25	25,8	6,1
Fenilbutazons	5	3,9	27
	10	8,5	23
	25	27,1	7,9

Metodes validācijas rezultāti liecina, ka metodes atgūstamība atbilst prasībām pret analītiskām metodēm, saskaņā ar kurām metodes atgūstamībai jābūt virs 70% (standartpiedevu koncentrāciju diapazonā 1 - 10 µg/kg) un virs 80% (standartpiedevu koncentrāciju diapazonā virs 10 µg/kg) [48].

3.4.5. Fenilbutazona atlieku apstiprināšana

Ņemot vērā to, ka vairākās valstīs ir aizliegta fenilbutazona izmantošana dzīvnieku ārstēšanai, īpaša uzmanība tika pievērsta fenilbutazona atlieku apstiprināšanas iespējām. Šajā nolūkā tika noteiktas fenilbutazona jonu attiecības paraugiem ar dažādas koncentrācijas standartpiedevām. Analīzei tika izmantota 2.3.nodaļā aprakstīta metode bez derivatizācijas stadijas. Rezultāti ir apkopoti 14. tabulā.

Relatīvā attiecība joniem, ko izmantoja izvēlēto jonu monitoringam GH-MS mērījumiem

14. tabula

Fenilbutazona piedevas koncentrācija (µg/kg)	Relatīvā jonu intensitāte, %			
	183 Da	252 Da	308 Da	309 Da
5	54,0	9,9	27,2	8,8
10	54,3	9,9	26,9	8,9
20	58,1	6,8	28,3	6,8
25	58,0	6,4	28,8	6,8
50	56,9	6,2	30,1	6,8
Vidējā relatīvā jonu intensitāte, %	56,3	7,9	28,3	7,6
Relatīvā standartnovirze, %	3,5	24,3	4,5	14,7
Maksimāli pieļaujamā relatīvā standartnovirze	± 10%	± 50%	± 15%	± 50%

Rezultāti liecina, ka dažādu jonu signālu attiecības izkliede atkarībā no standartpiedevas koncentrācijas nav būtiska. Jonu intensitātes relatīvā standartnovirze atbilst prasībām, kas ir noteiktas Eiropas Komisijas lēmumā Nr.2002/657/EC. Tādējādi metodi var veiksmīgi izmantot fenilbutazona atlieku apstiprināšanai. Tas ir ļoti svarīgi, jo vairākās valstīs netiek pieļauta fenilbutazona atlieku klātbūtne dzīvnieku izcelsmes produktos.

3.5. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas izmantošana veterināro preparātu atlieku noteikšanai

3.5.1. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācija

Veicot analītiskās metodes izstrādi, tika pārbaudīta iespēja izmantot gelfiltrācijas hromatogrāfijas metodi bioloģiskā parauga ekstrakta attīrīšanai no traucējošām vielām, nosakot veterināro preparātu atlieku koncentrāciju. Gelfiltrācijas hromatogrāfija ļauj atdalīt savienojumus ar augstu molekulmasu (taukus un olbaltumvielas) no mazmolekulāriem savienojumiem. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācija (frakciju tilpuma izvēle) tika veikta, izmantojot polihlorbifenilu (PHB) maisījumu ar molekulārām masām diapazonā 200-400 Da. Pārsvārā veterināro preparātu molekulārās masas arī atrodas šajā diapazonā, tāpēc datus ir iespējams izmantot, lai novērtētu metodes kvalitāti. Eksperimentā tika savāktas frakcijas ar intervālu 3 ml un noteiktas PHB koncentrācijas frakcijā ar gāzu hromatogrāfijas metodi. Rezultāti ir apkopoti 15.tabulā.

15. tabula

Gelfiltrācijas hromatogrāfijas frakcijas izvēle

Frakcija, ml	Gāzu hromatogrāfijas smaīļu laukumi, nosakot PHB saturu frakcijā				
	PHB28	PHD52	PHD138	PHD153	PHD180
22-25	7,2				7,4
25-28	6,9	11,3	44,6	25,5	28,2
28-31	133,8	141,4	252,8	276,5	308,9
31-34	241,7	160,1	281,6	346	397,1
34-37	132,1	88,9	154,4	194,2	221,6
37-40	79,8	55,1	97,7	117,5	136,4
40-43	55,9	40,3	66,7	81,1	97,3
43-46	42,1	28,2	47,7	58,6	67,9
46-49	27,8	18,5	35,3	42,5	50,9
49-50.5	23,4	17,5	29,7	39,2	41,5
PHB saturs frakcijās 25-49ml (%)	95,9	96,9	97,1	96,7	96,4
Frakcija, kas satur maksimālo PHB koncentrāciju	31-34 ml	31-34 ml	31-34 ml	31-34 ml	31-34 ml

3.5.2. Sulfanilamīdu attīrīšanas efektivitāte, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju.

Pēc gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācijas, izvēlētie parametri tika izmantoti sulfanilamīdu un trimetoprima hromatogrāfijas efektivitātes pārbaudei. 1 ml sulfanilamīdu standartšķīduma ar koncentrāciju 25 µg/ml tika attīrīts uz gelfiltrācijas hromatogrāfa, savācot 25 ml frakciju. Salīdzināšanai 1 ml standartšķīduma tika atšķaidīts līdz 25 ml ar etilacetāta un cikloheksāna maisījumu (1:1). Pēc linearitātes pārbaudes, sulfanilamīdu atgūstamība (R) tika novērtēta, salīdzinot eluāta un standartšķīduma absorbcijas (A_{pirms} , $A_{pēc}$). Rezultāti ir apkopoti 16. tabulā.

16. tabula

Sulfanilamīdu atgūstamība, veicot parauga attīrīšanu ar gelfiltrāciju

Nr	Savienojuma nosaukums	λ , nm	A_{pirms}	$A_{pēc}$	R, %
1.	sulfanilamīds	261	0,089	0,096	108
2.	sulfadiazīns	267	0,125	0,108	86
3.	sulfadimidīns	267	0,090	0,044	49
4.	sulfahloropiridazīns	272	0,085	0,063	74
5.	sulfadimetoksīns	269	0,082	0,083	101
6.	dapsons	258	0,047	0,025	53
7.	sulfatiazols	259	0,039	0,030	77
8.	sulfametizols	258	0,039	0,034	87

Rezultāti rāda, ka vidējā sulfanilamīdu atgūstamība, izmantojot paraugu attīrīšanu ar gelfiltrācijas ir 79%. Tas liecina par iespēju izmantot gelfiltrācijas hromatogrāfiju bioloģisko paraugu attīrīšanai. Iespējams, ka sulfanilamīdu zudumi ir saistīti ar mijiedarbību starp gela virsmu un molekulām un absorbciju uz stikla virsmas. Rezultātā notiek smaiļu paplašināšanās un atgūstamības samazināšanās.

3.5.2. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas izmantošana citu veterināro preparātu noteikšanai

Pēc gelfiltrācijas pielietošanas sulfanilamīdu noteikšanai tika pārbaudītas arī iespējas pielietot šo metodi visu šajā disertācijā izmantoto preparātu grupu analīzei. Eksperimentā tika

izmantoti desmit steroīdu savienojumi, fenilbutazons un levamizols. 17.tabulā ir apkopoti dati par savienojumu atgūstamību, veicot savienojumu attīrīšanu ar gelfiltrācijas metodi.

17. tabula

Veterināro preparātu atgūstamība, veicot parauga attīrīšanu ar gelfiltrācijas hromatogrāfiju

Savienojums	Absolūtā atgūstamība (n=3), %
Dienostrols	79
Heksestrols	65
Dietilstilbestrols	67
17 α -metiltestosterons	117
Boldenons	60
Nandrolons	71
17b-estradiols	67
Progesterons	66
Megestrola acetāts	60
Medroksiprogesterona acetāts	64
Levamizols	62
Fenilbutazons	114

Rezultāti rāda, ka gelfiltrācijas hromatogrāfija ir pielietojama visu šajā darbā izmantoto savienojumu noteikšanai. Kompensējot dažu savienojumu zemu atgūstamību ar iekšējo standartu palīdzību, metodi var efektīvi izmantot gan kvalitatīviem mērījumiem, gan kvantitatīvām analizēm. Ņemot vērā to, ka, lietojot šo metodi panāk mazmolekulāro vielu atdalīšanu no traucējošām vielām, metodi var izmantot arī citu veterināro zāļu analīzei.

SECINĀJUMI

1. Piedāvāti vairāki jauninājumi, kas iepriekš nav aprakstīti zinātniskajā literatūrā:

- pirmo reizi aprakstīta levamizola noteikšanas metode ar gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodi pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā un šķidrums hromatogrāfiju – tandēma masspektrometriju elektroizsmidzināšanas režīmā. Metodēm ir raksturīga augstāka jutībā salīdzinājumā ar GH-MS elektronu triecienu režīmā;
- piedāvāta hormonālo savienojumu noteikšanas metode, ar kuru, izmantojot vienu paraugu sagatavošanas shēmu, var noteikt stilbēnu (dietilstilbestrols, heksestrols, dienostrols), steroīdu (17α -metiltestosterons, boldenons, nandrolons, estradiols, testosterons, epitestosterons, progesterons, megestrola acetāts, medroksiprogesterons acetāts, estriols, estrons, cis-androsterons, hidroksiprogesterons) un rezorcīnskābes laktonu (zeranols, taleranolis) atliekas dzīvnieku izcelsmes produkcijā;
- izstrādāta nesteroīdo pretiekaisuma līdzekļu (fenilbutazons, ketoprofēns, naproksēns, fenoprofēns un diklofenaks) atlieku analīzes metode, izmantojot savienojumu metilēšanu ar trimetilsilīldiazometānu un gāzu hromatogrāfiju – masspektrometriju;
- izstrādāta šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metode, kas ļauj vienlaicīgi noteikt trimetoprimu, sulfanilamīdu un nitroimidazolu grupas preparātus;
- veterināro preparātu atlieku noteikšanai pielietotās shēmas ir izmantotas fentanila farmakokinētikas pētījumiem;
- eksperimentos parādīts, ka gelfiltrācijas hromatogrāfija ir izmantojama kā unificēta paraugu sagatavošanas metode vienlaicīgai levamizola, fenilbutazona, steroīdu un sulfanilamīdu atlieku analīzei.

2. Kopumā šajā darbā ir izstrādātas jaunas metodes 33 savienojumu noteikšanai. Tie pārstāv dažādas veterināro savienojumu grupas: antibiotikas, pretparazītāros preparātus, augšanas stimulatorus, nesteroīdos pretiekaisuma līdzekļus. Izstrādāto metožu kvalitāte pārbaudīta, veicot metodes validāciju un nosakot dažādus metodes parametrus (selektivitāte, linearitāte, atgūstamība, atkārtojamība).

3. Izstrādātās metodes aprobētas Valsts Veterinārmedicīnas diagnostikas centra Pārtikas kontroles laboratorijā Latvijas dzīvnieku izcelsmes produkcijas kontrolē, nosakot veterināro zāļu atlieku klātbūtni. Vairāk kā 500 paraugu analīžu rezultāti kopumā liecina par dzīvnieku izcelsmes produkcijas nekaitīgumu. Tomēr dažu veterināro zāļu atlieku konstatēšana (levamizols un progesterons) liecina par nepieciešamību turpināt sistemātisku kontroli, izmantojot drošas un jutīgas metodes.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. V.Bartkevičs, G.Kučkovska, J.Ģībietis. Levamizola atlikumdaudzumu noteikšana pārtikas produktos ar hromatogrāfijas un masspektrometrijas metodēm. – Latvijas ķīmijas žurnāls, 2003, Nr.2, 159.-170.lpp.
2. V.Barkevičs, J.Ģībietis. Acylation of steroid compounds with fluorinated anhydrides: reaction pattern, massspectrometric fragmentation and applicability of derivates for analysis in chemical ionization mode. – RTU zinātniskie raksti, Materiālzinātne un lietišķā ķīmija, 2003, Nr.6, 33.-39.lpp.
3. V.Bartkevičs, J.Ģībietis. Determination of residual phenylbutazone in food products using gas chromatography – mass spectrometry. – Latvijas ķīmijas žurnāls, 2004, Nr.1, 51.-57.lpp.
4. V.Bartkevičs, G.Kučkovska. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in meat and milk by massspectrometric methods. Proceedings of the Euroresidue V conference, 2004, Nr.1, pp.291-297.
5. V.Bartkevičs, J.Ģībietis. Nitroimidazolu, sulfanilamīdu un trimetoprima atlikumdaudzumu noteikšana pārtikas produktos ar šķīduma hromatogrāfijas - tandēma masspektrometrijas metodi. – Latvijas ķīmijas žurnāls, 2004, Nr.3, 263.-269.lpp. (pieņemts publicēšanai).
6. N.Berzina, G.Smirnova, V.Titajevs, V.Bartkevics, I.Bula. Chickens as an animal model for the investigation of pharmacokinetics of injection formulation. – Baltic J.Lab.Anim.Sci, 2003, Nr.13, pp.13-18.
7. В.Д.Соколов, Г.Д.Ноздрин, Ю.Н.Рыбаков. Лекарственные средства, применяемые в ветеринарной практике. Новосибирск: Наука, 1992, 272 с.
8. W. Löscher, F.R.Ungemach, R.Kroker. Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Berlin: Verlag Paul Parey, 1991, 381 Seit.
9. D.Thienpont, O.F.J.Vanparijs, A.H.M.Racymaekers, J.Vandenberk, P.J.A.Demoen, F.T.N.Allewijn, C.J.E. Niemegeers, K.H.L.Schellekens, P.A.J.Janssen. Tetramisole 8299, a new potent broad spectrum anthelmintic.-Nature, 1966, vol.209, pp.1084-1086.
10. B-G.Osterdahl, H.Johnsson, I.Nordlander. Rapid Extrelut column method for determination of levamisole in milk using high-performance liquid chromatography.- Journal of Chromatography, 1985, vol.337, pp.151-155.
11. R.J.Heitzman. Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: Reference materials and methods. Oxford: Blackwell scientific publications. 1994, 512 pp.

12. The United States Pharmacopoeia USP 24. Philadelphia: National Publishing, 1999, 2569 p.
13. European Pharmacopoeia 3rd edition. Strasbourg: Council of Europe Publishing, 1997, 1799 p.
14. Xu Gang. Fixed pH-titration of weakly acidic and basic drugs.- Fenxi Shianshi, 1997, vol.20, pp.453-463.- C.A. vol.128, 196740v.
15. A.S.Amin. Quantitative determination of some pharmaceutical veterinary formulation using bromcresol purple and bromcresol green.- Anal.Lett., 1997, vol.30, No14, pp.2503-2513.
16. M.Chélet, S.De Baere, S.Croubels, P.De Backer. Quantitative analysis of levamisole in porcine tissues by high-performance liquid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. - J.Chromatogr.B., 2000, vol.742, No.2, pp.283-293.
17. F.J.Schenck, L.V.Podhorniak, R.Wagner. A highly sensitive gas chromatographic determination of levamisole in milk.-Food Additives and Contaminants, 1998, vol.15, No.4, pp.411-414.
18. C.G.Chappell, C.S.Creaser, M.J.Shepherd. Modified on-column interface for coupled high performance liquid chromatography - gas chromatography and its application to the determination of levamisole in milk.-Journal of Chromatography, 1992, vol.626, pp.223-230.
19. В.Д.Шатц, О.В.Сахарова. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988, 388 с.
20. M.Alvinerie, P.Galtier, G.Escoula. Ion-pair high-performance liquid chromatographic assay of levamisole in biological fluids.- Journal of Chromatography, 1981, vol.223, pp.445-448.
21. R.Woestenborghs, L.Michielsen, J.Heykants. Determination of levamisole in plasma and animal tissues by gas chromatography with thermoionic specific detection. - Journal of Chromatography, 1981, vol.224, pp.25-32.
22. J.R.Perkins, D.E.Games, J.R.Startin, J.Gilbert. Analysis of veterinary drugs using supercritical fluid chromatography and supercritical fluid chromatography - mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1991, vol.540, pp.257-270.
23. I.Purviņš. Praktiskā farmakoloģija. Medikamentu informācijas centrs, 1994, 582 lpp.
24. R.J.McCracken, D.E.Spence, D.G.Kennedy. Comparison of extraction techniques for the recovery of veterinary drug residues from animal tissues. – Food Addit Contam., 2000, vol. 17(11), pp. 907 – 914.

25. M.D.Smedley, J.D.Weber. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. – J. Assoc. Off Anal. Chem., 1990, vol. 73(6), pp. 875 – 879.
26. G.K.Kristiansen, R.Brock, G.Bojesen. Comparison of flow injection / thermospray MS/MS and LC/Thermospray MS/MS Methods for determination of sulfonamides in meat and blood. – Anal. Chem., 1994, vol. 66, pp. 3253 – 3258
27. J.A.Tarbin, P.Charke, G.Shearer. Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography – mass – selective detection and liquid chromatography – mass spectrometry. – J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 1995, vol. 729(1-2), pp. 127 - 138.
28. P.Shearan, M.O’Keeffe, M.R.Smyth. Comparison of matrix solid phase dispersion (MSPD) with a standard solvent extraction method for sulphamethazine in pork muscle using high performance liquid and thin layer chromatography. – Food Add. Contam., 1994, vol. 11(1), pp. 7 –15.
29. A.E.Mooser, H.Koch. Confirmatory method for sulfonamide residues in animal tissues by gas chromatography and pulsed positive ion – negative ion – chemical ionization mass spectrometry. AOAC Int., 1993, vol. 76(5), pp. 976 – 982.
30. J.P.Abjean. Planar chromatography for the multiclass, multiresidue screening of chloramphenicol, nitrofurantoin and sulfonamide residues in pork and beef., AOAC Int., 1997, vol. 80(4), pp. 737 – 740.
31. C.E.Tsai, F.Kondo, J.Ueyama, J.Azama. Determination of sulfamethazine residue in chicken serum and egg by high – performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. – J. Chromatogr. Sci., 1995, vol. 33(7), pp. 365 – 369.
32. T.A.Gehring, L.G.Rushing, H.C.Thompson. Determination of sulfonamides in edible salmon tissues by liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. – AOAC Int., 1997, vol. 80(4), pp. 751 – 755.
33. M.D.Smedley, J.D.Weber. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. – J. Assoc. Off Anal. Chem., 1990, vol. 73(6), pp. 875 – 879.
34. K.Albert, K.L.Ritter, R.L.Smallidge. Determination of sulfathiazole in type C medicated swine feed by reversed phase liquid chromatography with post-column derivatization. – J.AOAC Int., 2003, vol.86 (4), pp.623 – 630.
35. S.Croubels, S.De Baere, P.De Backer. Comparison of a liquid chromatographic method with ultraviolet and ion trap tandem mass spectrometric detection for the simultaneous determination of sulfadiazine and trimetoprim in plasma from dogs. – J.Chromatogr.B., 2003, vol.788 (1), pp.167-178.

36. J.Polzer, P.Gowik. Validation of a method for the determination and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography – negative ion chemical ionisation mass spectrometry. - *J.Chromatogr.B.*, 2001, vol. 761, pp. 47 - 60.
37. A.Cannavan, D.G.Kennedy. Determination of dimetridazole in poultry tissues and eggs using liquid chromatography – thermospray mass spectrometry. – *Analyst*, 1997, vol.122 (9), pp.963-966.
38. K.W.Hinchcliff, A.R.Sams. Drug use in performance horses. The veterinary clinics of North America. *Equine practise*. 1993, vol.9 (3) pp 449 - 667
39. P.Gowik, B.Julicher, S.Uhlig, Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography – photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. - *J.Chromatogr.*, 1998, vol. 716, pp. 221 - 232.
40. I.Rodriguez, J.B.Quintana, J.Carpinteiro, A.M.Carro, R.A.Lorenzo, R.Cela. Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography – mass spectrometry as tert-butyltrimethylsilyl derivatives. – *J.Chromatogr.A.*, 2003, vol.985 (1-2), pp.265-274.
41. E.Grippa, L.Santini, G.Gastellano, M.T.Gatto, M.G.Leone, L.Saso. Simultaneous determination of hydroxycortisone, dexamethasone, indomethacin, phenylbutazone and oxyphenilbutazone in equine serum by high performance liquid chromatography. - *J.Chromatogr.B.*, 2000, vol. 738, pp. 17 - 35.
42. T.Marunaka, T.Shibata, Y.Minami, Y.Umeno. Simultaneous determination of phenylbutazone and its metabolites in plasma and urine by high performance liquid chromatography. - *J.Chromatogr.*, 1980, vol. 183 (3), pp. 331 - 338.
43. A.Bakkali, E.Corta, I.A.Berrueta, B.Gallo, F.Vicente. Study of the solid-phase extraction of diclofenac sodium, indomethacin and phenylbutazone for their analysis in human urine by liquid chromatography. - *J.Chromatogr.B.*, 1999, vol. 729, pp. 139 - 145.
44. L.M.Neto, M.H.Andraus, M.C.Salvadori. Determination of phenylbutazone and oxyphenylbutazone in plasma and urine samples of horses by high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. - *J.Chromatogr.B.*, 1996, vol. 678, pp. 211 - 218.
45. E.J.De Veau. Determination of non-protein bound phenylbutazone in bovine plasma with ultrafiltration and liquid chromatography with ultraviolet detection. - *J.Chromatogr.B.*, 1999, vol.721 (1), pp.141-145.
46. Singh A.K., Jang Y., Mishra U., Granley K. Simultaneous determination of flunixin, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in

plasma and urine by high performance liquid chromatography and gas chromatography – mass spectrometry. - *J.Chromatogr.*, 1991, vol. 568 (2), pp. 351 – 361.

47. H.H.Maurer, F.X.Tauvel, T.Kraemer. Screening procedure for detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography – mass spectrometry after extractive methylation.- *J.Anal.Toxicol.*, 2001, vol.25 (4), pp.237-244.

48. Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, vol.L221, pp.8-36

49. K.Santarius, E.Rosel. Der MSD als Multidetektor bei der Analytik von Hormonrückständen. - *Fleischwirtsch.*, 1989, Vol.69(12), 1841-1845pp.

50. S.Prevoost, B.L.Bizec, P.Marchand, F.Monteau, F.Andre. Detection of anabolic steroid residues in hair by gas chromatography coupled to mass spectrometry. “Proceedings of the EuroResidue IV Conference 'Residues of Veterinary Drugs in Food” Veldhoven, The Netherlands, 2000, 856-862

51. F.W.McLafferty, F.Turecek. Interpretation of mass spectra 4th edition. Sausalito, California: University science books, 1993, 371 p.

52. П.Скунмакерс. Оптимизация селективности в хроматографии. Москва: Мир, 1989, 399с.

53. J.C.Miller, J.N.Miller. Statistics for analytical chemistry. New York: John Wiley & Sons, 1988, 227 pp.

54. J.E.Smith, R.Pasarella, J.C.Wyckoff. Gas-liquid chromatographic determination of levamisole residue in bovine milk. - *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1976, Vol.59, 954-958pp.

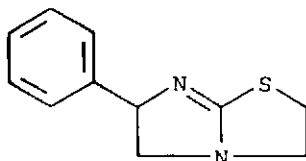
55. J.H.Rojas, R.Guevara, L.Leiva. Development and validation of an analytical method (HPLC-RP) for the determination of levamisole.- *Rev.Colomb.Cienc.Quim.-Farm*, 1997, vol.26, pp.27-31.- *C.A.* vol.128, 5334le.

V. Bartkevičs, G. Kučkovska, J. Ģībietis

LEVAMIZOLA ATLIKUMDAUDZUMU NOTEIKŠANA PĀRTIKAS PRODUKTOS AR HROMATOGRĀFIJAS UN MASSPEKTROMETRIJAS METODĒM

*Valsts Veterinārmedicīnas diagnostikas centrs
Latvijas Universitāte*

Levamisols ir antihelmintu preparāts, ko plaši lieto veterinārijā.



Ja levamizolu lieto dzīvnieku ārstēšanai, ir nepieciešams laiks, lai ārstnieciskais preparāts tiktu izvadīts no organisma. Ja tas nav ievērots, levamisols ar dzīvnieku izcelsmes pārtikas produkciju var nonākt cilvēka organismā, apdraudot tā imūnsistēmu. Pārtikas produkcijas nekaitīguma kontrolei nepieciešamas drošas un jutīgas analīzes metodes.

Zinātniskajā literatūrā levamizola noteikšanai bioloģiskajās matricās tiek piedāvāta gāzu hromatogrāfijas metode, izmantojot nepolārās kolonnas DB1 vai DB5, ar fosfora slāpekļa selektīvo detektoru [1, 2] vai masspektrometrisko detektoru elektronu triecienu jonizācijas režīmā [3], kā arī šķīdumu hromatogrāfijas metode, lietojot C8 vai C18 kolonnas un UV detektoru [4, 5] vai masspektrometrisko detektoru molekulārā jona fragmentu skenēšanas režīmā [6].

Parauga sagatavošanai galvenokārt izmanto ekstrakciju ar etilacetātu vai hloroformu sārmainā šķīdumā. Ekstrakta attīrīšanai lieto šķīduma – šķīduma ekstrakciju [1, 3], cietās fāzes ekstrakciju uz C18 kolonnas [7] un šķīdumu hromatogrāfiju [5].

Analizējot levamizola saturu pienā ar šķīdumu hromatogrāfijas metodi un UV detektoru, minimālā nosakāmā levamizola koncentrācija ir 20—50 µg/l [4]. Izmantojot termojonu detektoru, var panākt jutību 5 µg levamizola /kg parauga. [2]. Literatūrā ir dati par minimālo nosakāmo levamizola koncentrāciju 1 µg/l piena [1]. Bet šādu augstu jutību panāk ar lielu iesvaru un ilgstošu, darbietilpīgu parauga attīrīšanu. Darba autori izmantojuši četras pārejas starp organiskiem šķīdinātājiem un ūdens fāzi. Metodei nepieciešami lieli reaģentu daudzumi (viena parauga analīzei 300 ml etilacetāta, 200 ml cikloheksāna un 100 ml dihlormetāna), kas palielina metodes izmaksas. Bez tam, sakarā ar sarežģītu parauga sagatavošanas procedūru palielinās arī levamizola zudumu vai piesārņojuma iespējas.

Lai uzlabotu levamizola noteikšanas jutību un automatizētu paraugu sagatavošanas procedūras, šajā pētījumā tiek piedāvāta gāzu hromatogrāfijas – mas-

spektrometrijas (GH/MS) metode pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā un šķidrums hromatogrāfija – tandēma masspektrometrija (ŠH/MS/MS) jonu reakcijas skenēšanas režīmā, paraugu sagatavošanai izmantojot šķidrums – šķidrums ekstrakciju, gelfiltrācijas hromatogrāfiju vai cietās fāzes ekstrakciju. Apstrādāti levamizola fragmentācijas procesi dažādos jonizācijas režīmos un salīdzinātas dažādas paraugu sagatavošanas metodes. Īpaši uzmanība pievērsta gelfiltrācijas hromatogrāfijai, ņemot vērā iespēju pielietot šo procedūru arī citu veterināro zāļu kontrolei.

EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Mērījumu apstākļi un izmantotās iekārtas. Gāzu hromatogrāfijas mērījumi tika veikti, izmantojot firmas *Hewlett Packard* gāzu hromatogrāfu HP 6890 ar *Hewlett Packard* masselektīvo detektoru HP 5973 un automātisku paraugu ievadišanas iekārtu HP 7683. Gāzu hromatogrāfijas kolonna: 30 m × 0,25 mm, nekustīgā fāze DB 5 (0,25 μm slānis). Gāzhromatogrāfiskās analīzes parametri: nesējgāze — hēlijs ar plūsmas ātrumu 1 cm³/min, injektora temperatūra 240 °C, parauga tilpums 1 μl. Kolonnas temperatūras programma: 60 °C → 240 °C (30 °C/min); 240 °C (4 min); 240 °C → 260 °C (10 °C/min); 260 °C (4 min). Gāzu hromatogrāfa masspektrometra pārejas temperatūra 280 °C. Masspektrometra masu ass kalibrēšana un jonu avota regulēšana pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā veikta ar perfluoro-5,8-dimetil-3,6,9-trioksidodekānu (PFDTD) pēc joniem ar *m/z* 41, 267, 599. Elektronu enerģija 156,2 eV, jonu avota temperatūra 250 °C, kvadrupola temperatūra 106 °C, spriegums uz elektrodiem 1153 V.

ŠH/MS/MS mērījumiem izmantots *Micromass Quattro II* masspektrometrs ar trīskāršo kvadrupolu sistēmu, *Waters Alliance 2690* šķidrums hromatogrāfs ar *Waters Symmetry C18* kolonnu (3,9 × 150 mm, nekustīgās fāzes slānis 5 μm). Šķidrums hromatogrāfijas parametri izokrātiskā režīmā: eluents 60% H₂O, 39% CH₃OH, 1% CH₃COOH, analīzes laiks 8 min, plūsmas ātrums 1 ml/min un parauga tilpums 10 μl. Masspektrometrijas parametri: pozitīvās elektriskās izsmidzināšanas jonizācijas (ES⁺) režīms, jonu reakciju monitorings, 204,9 → 177,9 skenēšanas pāreja, konusa spriegums 35,0 V, sadursmju enerģija 22,0 eV, spriegums uz kapilāra 3,5 kV.

Gelfiltrācijas hromatogrāfijas eksperimentiem izmantots *Waters* firmas sūknis 515, automātiskais paraugu ievadītājs *Waters 717-plus*, frakciju kolektors *Waters II* un stikla kolonna (11 × 500 mm), kas pildīta ar Bio-Beads S-X3 gelu. Kustīgā fāze: etilacetāts/cikloheksāns (tilpuma attiecība 1:1); plūsmas ātrums 1 ml/min.

Darbam par standartvielu izmantots levamizola hidrohlorīds (*Sigma*). Pagatavoti tā pamatšķidrums metanolā (1 mg/ml) un darba šķidrums hloroformā (GH) vai kustīgā fāzē (ŠH) ar koncentrācijām no 1 līdz 10 μg/ml.

Paraugu sagatavošana, izmantojot šķidrums – šķidrums ekstrakciju. Parauga iesvaru (10 g vai ml) ievieto centrifūgas mēģenēs, pievieno 5 g bezūdens nātrija sulfāta, 1 ml 50% KOH šķidrums un 15 ml etilacetāta. Homogenizē maksimālā ātrumā 2 min. Horizontālā maisītājā paraugus maisa 15 min. Centrifugē 15 min ar 3000 apgr/min. Etilacetāta slāni nolej citā mēģenē. Atkārtoti ekstrakcijas procedūru ar 15 ml etilacetāta. Atdala otro etilacetāta slāni un pievieno pirmajam. 20 ml iegūtā šķidrā parauga pārnes centrifūgas mēģenē, pievieno 5 ml 0,5 M HCl, intensīvi krata 2 min un tad centrifugē 5 min ar 3000 apgr/min. Atdala etilacetāta slāni. Ūdens slāni pārnes tīrā centrifūgas mēģenē. Pievieno 1 ml 50% KOH šķidrums un sakrata. Pievieno 100 μl hloroforma, krata 1 min. Izmantojot 100 μl šļirci, pārnes visu organisko slāni 200 μl pudeļī. Ietvaicē līdz sausam slāpekļa plūsmā. Pievieno 100 μl hloroforma un izšķīdina samaisot. Gāzhromatogrāfiskai analīzei ņem 1 μl.

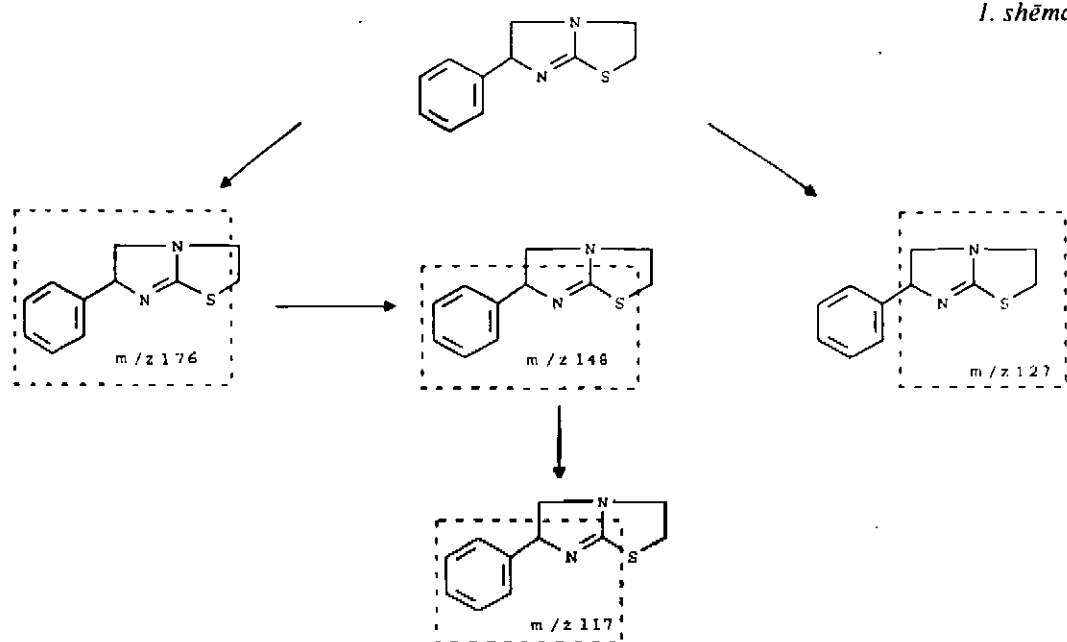
Paraugu sagatavošana, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju. Parauga iesvaram (5 g vai ml) pievieno 5 g bezūdens nātrija sulfāta, 1 ml 50% KOH šķidrums un 15 ml etilacetāta. Veic levamizola ekstrakciju, kā aprakstīts iepriekš. Atkārtoti ekstrakcijas procedūru ar 15 ml etilacetāta. Apvieno etilacetāta slāņus un ietvaicē līdz sausam ar rotācijas ietvaicētāju. Izšķīdina sauso atlikumu 4 ml cikloheksāna/etilacetāta maisījumā (tilpuma attiecība 1:1). Pirms izmantošanas gelfiltrācijas hromatogrāfijai šķīdumu filtrē caur 0,45 μm *Millipore Millex* filtru. Filtrātu (1 ml) hromatogrāfē ar gelfiltrācijas kolonnu. Eluēšanas tilpums no 25 līdz 49 ml (kopā 24 ml). Ietvaicē šķīdumu līdz sausam un izšķīdina 100 μl izooktāna. Gāzhromatogrāfiskai analīzei ņem 1 μl šķidrums.

Paraugu sagatavošana, izmantojot cietās fāzes ekstrakciju ar Oasis MCX kolonnām. Parauga iesvaram (5 g vai ml) pievieno 5 g bezūdens nātrija sulfāta, 1 ml 50% KOH šķīduma un 15 ml etilacetāta. Veic levamizola ekstrakciju, kā aprakstīts iepriekš. Atkārtoto ekstrakcijas procedūru ar 15 ml etilacetāta. Apvieno etilacetāta slāņus. 20 ml iegūtā šķidrā parauga pārnes centrifūgas mēģenē. Pievieno 5 ml 0,5 M HCl, intensīvi krata ar roku 2 min un tad centrifugē 5 min ar 3000 apgr/min. Atdala etilacetāta slāni. Cietās fāzes ekstrakcijai ar Oasis MCX (sorbenta masa — 60 mg) kolonnu ņem 4 ml 0,5 M HCl slāņa. Kondicionē kolonnu ar 1 ml metanola un 1 ml ūdens. Uznes paraugu (4 ml 0,5 M HCl). Skalo kolonnu ar 1 ml 1 N HCl un 1 ml metanola. Eluē levamizolu ar 2 ml 5% amonjaka šķīduma metanolā. Paraugu ietvaicē un atkarībā no detektēšanas veida izšķīdina 100 μl izooktāna vai kustīgās fāzes.

REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒŠANA

Levamizola masspektra uzņemšana ar dažādām jonizācijas metodēm

Lai izmantotu masspektrometriju kvantitatīvajā analīzē un izvēlētos optimālus mērīšanas apstākļus, nepieciešama analizējamās vielas masspektra uzņemšana. Elektronu triecienu jonizācijas režīmā galvenā smaile atbilst 204 Da, kas raksturo levamizola molekulāro jonu. Iespējamā levamizola fragmentācija ir parādīta 1. shēmā.

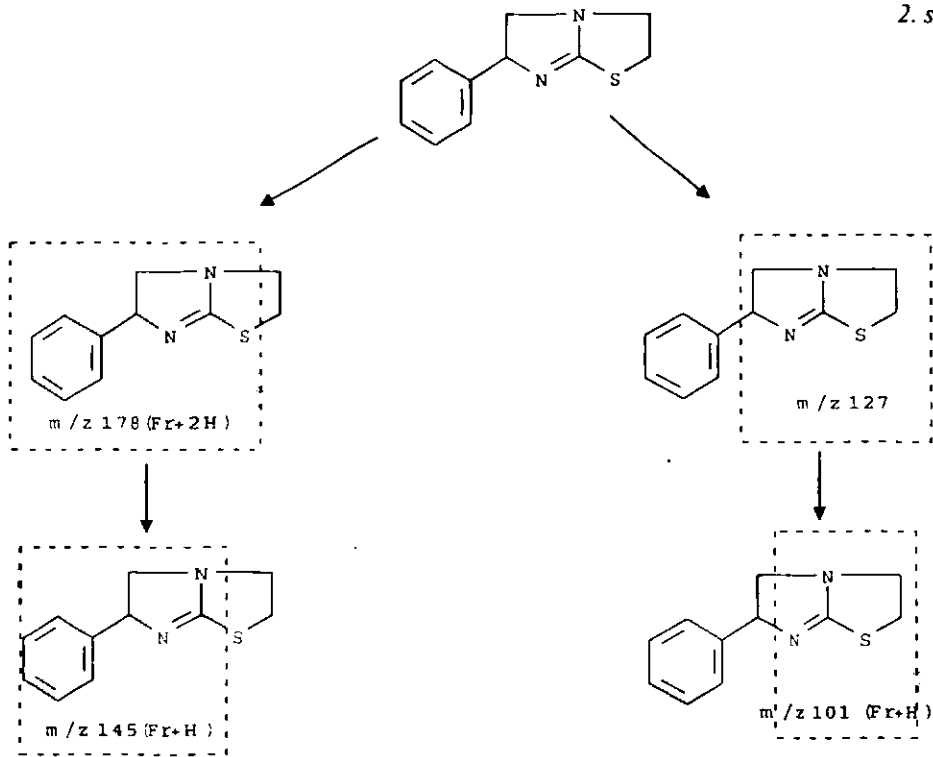


Jona ar masu 176 Da veidošanās ir saistīta ar tiazolidīna cikla šķelšanu un stabila neitrāla fragmenta $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ atšķelšanos. Šī sabrukšanas shēma viegli realizējas C–N un C–S saišu nestabilitātes dēļ [8]. Sakarā ar elektronu triecienu lielo enerģiju, 176 Da jonā notiek C–N un α -C–C saišu šķelšanās, veidojoties stabilam jonam ar masu 148 Da. Šī jona stabilitāti varētu izskaidrot ar tā ciklizāciju. Jona ar masu 127 Da veidošanās notiek, šķeloties saitei starp diviem gredzeniem — benzola un 2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b]tiazola.

Masspektram, kas iegūts negatīvās ķīmiskās jonizācijas (NĶJ) ar metānu režīmā, galvenā smaile ir $(\text{M}-\text{H})^-$. Tātad, levamizolam NĶJ režīmā vairāk raksturīgas protona pārneses reakcijas, nevis elektrona satveres procesi. Jona ar masu 148 Da veidošanās varētu notikt līdzīgi kā elektronu triecienu jonizācijas (ETJ) procesā.

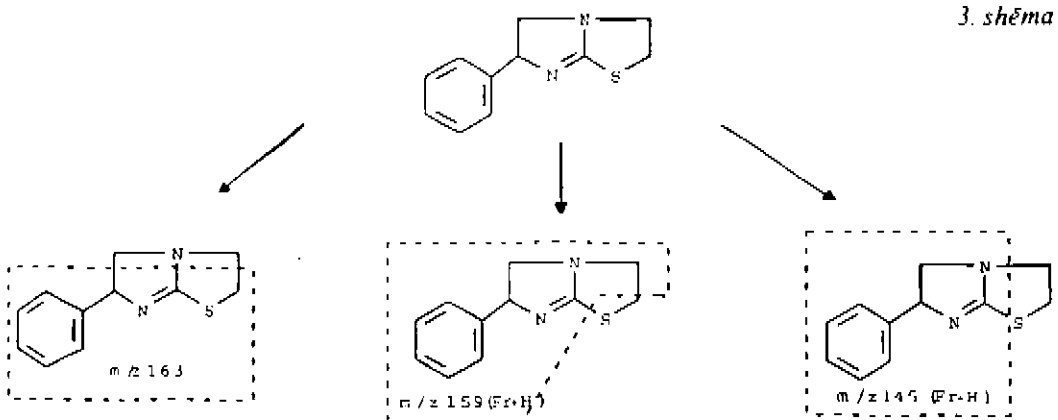
Pozitīvās ķīmiskās jonizācijas ar metānu masspektram ir raksturīga mazāka fragmentācija, salīdzinot ar elektronu triecienu jonizācijas režīmu. Galvenā

smaile ir $(M+H)^+$, kas veidojas protona pārnese procesā. Iespējamā fragmentācija ir piedāvāta 2. shēmā.



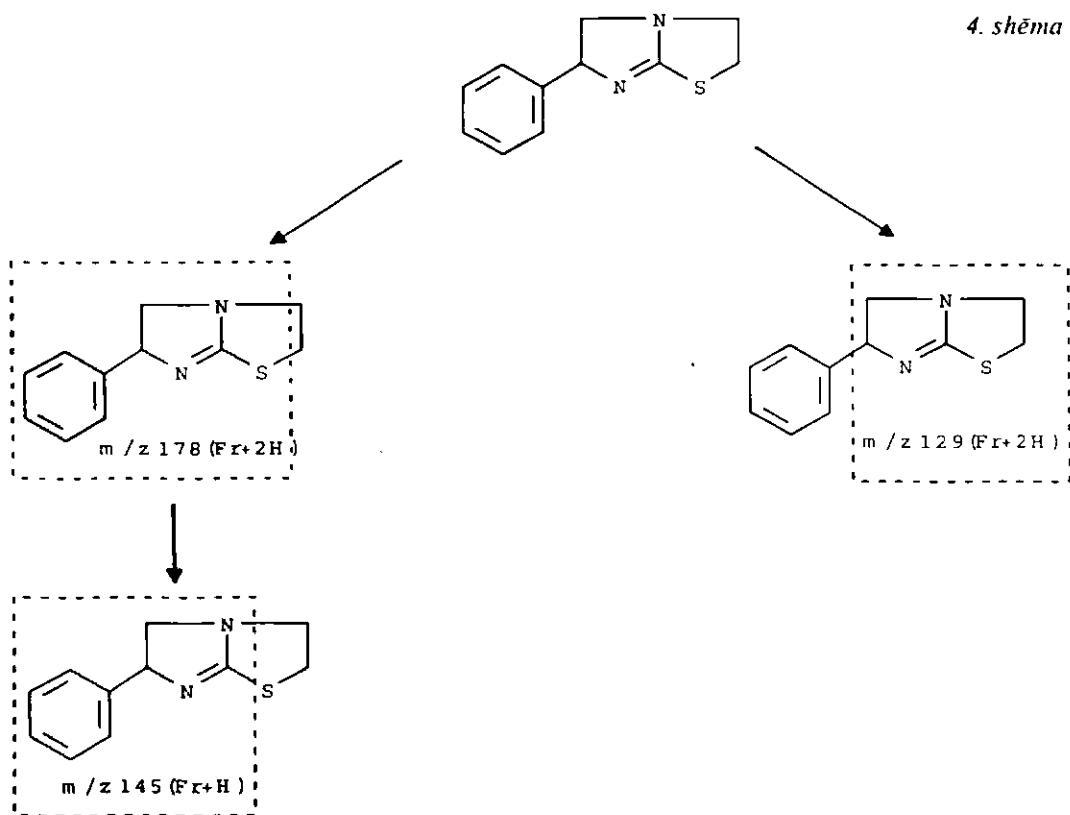
Jona ar masu 178 Da veidošanos ietekmē saišu C–N un C–S nestabilitāte. Pēc $CH_2=CH_2$ atšķelšanās jons pievieno divus protonus, jo protonu pārnese procesi pozitīvās ķīmiskās jonizācijas (PKJ) režīmā ir ar lielu varbūtību. Dotajos apstākļos saites C–S šķelšanās notiek izdevīgāk nekā gredzena atvēršanās, tāpēc veidojas jons ar masu 145 Da. Jona ar masu 127 Da veidošanās pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā notiek līdzīgi kā elektronu triecienu jonizācijas apstākļos. Tālākā jona ar masu 127 Da fragmentācija notiek ar $CH_2=CH_2$ atšķelšanos, šķeloties divām C–N saitēm.

Jona ar masu 163 Da veidošanās ES^+ režīmā (3. shēma) izskaidrojama ar C–N un divu α -C–C saišu sabrukšanu.



Ļoti iespējams, ka 163 Da jons stabilizējas, veidojot pieclocckļu ciklu. Jona ar masu 159 Da veidošana notiek, atšķeloties $CH_2=S$ fragmentam. Jons ar masu 145 Da veidojas līdzīgi kā fragmentācijā pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā.

Veicot MS/MS mērijumus, kvadrupola Q_1 parametri tika uzstādīti tā, lai tas filtrētu tikai 205 Da jonus. Reakciju kamerā Q_2 jons ar masu 205 Da sadursmju ar argona atomiem rezultātā fragmentējas tālāk. Fragmentācijas shēma ir visai līdzīga fragmentācijai pozitīvās ķīmiskās jonizācijas apstākļos (4. shēma).

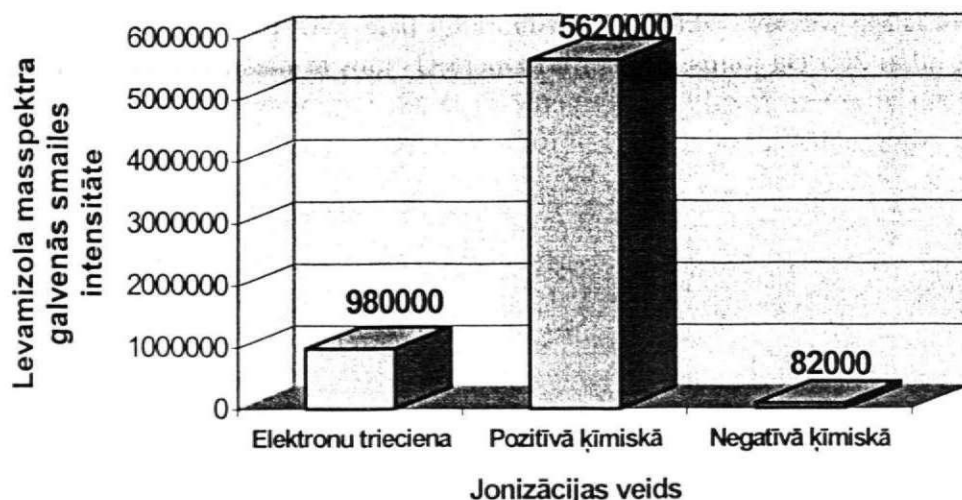


Saišu C–N un C–S nestabilitātes dēļ notiek gredzena atvēršana un $CH_2=CH_2$ atšķelšanās. Jons ar masu 178 Da ir galvenā smaile 205 Da šķembu jonu maspektrā ES^+ režīmā (sadursmju enerģija 22 eV). Atšķirībā no pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīma, 127 Da jons ES^+ jonizācijas režīmā pievieno divus protonus, veidojot jonu ar masu 129 Da.

Kā redzams no iegūtajiem rezultātiem, levamizola fragmentācijas shēmu stipri ietekmē jonizācijas veids un jonizācijas enerģija. Fragmentācija pārsvarā notiek 2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b]tiazola sistēmā. Visintensīvākā fragmentācija ir raksturīga elektronu triecienu jonizācijai. Pozitīvās un negatīvās ķīmiskās jonizācijas spektriem ir raksturīgs stipri izteikts molekulārā jona signāls. Elektriskās izsmidzināšanas jonizācijas gadījumā maspektrā galvenā smaile atbilst levamizola molekulārajam jonam un pārsvarā ir fragmenti ar lielu molekulāro masu, kas liecina par to, ka ES^+ ir maiga jonizācijas metode.

Masspektrometra parametru optimizēšana levamizola noteikšanai

Levamizola standartšķīdums ar koncentrāciju 1 mg/ml atkārtoti tika ievadīts gāzu hromatogrāfā ar masspektrometru, kas darbojās dažādos jonizācijas režīmos. Iegūti trīs masspektri, kas atbilst elektronu triecienu, pozitīvās un negatīvās ķīmiskās jonizācijas režīmiem. Par salīdzināšanas kritēriju izvēlēta maspektra galvenās smailes intensitāte. Rezultāti parādīti 1. att.



1. att. Levamisola masspektra galvenās smailes intensitāte atkarībā no jonizācijas veida

Masspektra galvenās līnijas intensitāte raksturo metodes jutību. Vislielākā analītiskā signāla intensitāte raksturīga ķīmiskās jonizācijas režīmam. Tas varētu būt izskaidrojams ar levamisola molekulas protonēšanas zemo enerģiju un līdz ar to lieliem iznākumiem CH_4 pozitīvās ķīmiskās jonizācijas procesā. Ļoti zema negatīvās ķīmiskās jonizācijas analītiskā signāla intensitāte ir saistīta ar levamisola molekulā esošo atomu zemo elektrontieksmi. No rezultātiem var secināt, ka levamisola noteikšanai vispiemērotākie ir elektronu trieciens vai pozitīvās ķīmiskās jonizācijas darbības režīmi. Optimālo metodes jutību var sasniegt tieši pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā.

ŠH/MS/MS darbības optimizēšanā ļoti svarīgi ir izvēlēties tādu potenciālu starpību uz konusa un sadursmju enerģiju, lai galvenās smailes intensitāte un līdz ar to metodes jutība būtu maksimālā. Potenciālu starpība uz konusa ietekmē prekursora jona ar masu 205 Da veidošanos. Eksperimentā noskaidrots, ka levamisola molekulārā jona intensitāte sasniedz maksimālo vērtību, ja spriegums ir 35 V.

Sadursmju enerģija ietekmē procesus, kas notiek reakciju kamerā Q_2 . Jons ar masu 205 Da sadursmju rezultātā ar argona molekulām fragmentējas, un analīzes jutības paaugstināšanas nolūkos ir nepieciešams izvēlēties šķembu jonu ar vislielāko intensitāti. Lai paaugstinātu mērīšanas selektivitāti, racionāli ir izvēlēties šķembu jonu ar lielāku masu, jo tad fona ietekme ir vismazākā. Mērījumi liecina, ka 205 Da jona fragmentācija ar sadursmes enerģiju 5 eV nenotiek. Šķembu jona ar masu 178 Da intensitāte ir maksimālā pie argona molekulu enerģijas 25 eV, bet pie 45 eV šis jons pilnīgi pārvēršas fragmentos ar zemāku masu. Uzņemot 178 Da jona signāla intensitātes atkarību no sadursmju enerģijas 20–30 eV intervālā, analīzei izvēlēta sadursmju enerģija 22 eV.

Levamisola identifikācija

Identificējot savienojumu ar hromatogrāfiskām metodēm, par kritēriju visbiežāk izmanto izdalīšanas laiku. Lai paaugstinātu analīzes drošību, ieteicams uzņemt analizējamā parauga hromatogrammu, lietojot citas polaritātes kolonnu. Šī metode prasa vairāku kolonnu izmantošanu un ir ļoti darbietilpīga. Masspektrometrijas metodes izmantošana ļauj vienkāršot identifikācijas procedūru.

Lai noteiktu levamisola klātbūtni analizējamā paraugā, uzņem masspektru GH/MS elektronu triecienu jonizācijas režīmā. Levamisola masspektram rakstu-

rīga jonu ar masu 121, 148, 203, 204 Da klātbūtnē. Aprēķina attiecīgo līniju intensitāti attiecībā pret galveno smailli ar m/z 148.

Elektronu triecienu jonizācijas masspektrometrijas rezultāti apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

Levamisola jonu relatīvā intensitāte masspektūrā GH/MS elektronu triecienu jonizācijas režīmā ($n=10$)

Levamisola koncentrācija, $\mu\text{g/ml}$	Relatīvā intensitāte joniem ar m/z , %			
	121	148	203	204
1	44±12	100	47±5	67±16
2	35±4	100	47±4	79±15
5	26±3	100	45±3	90±10

Rezultāti rāda, ka atkarībā no levamisola koncentrācijas mainās arī jonu intensitāte. Šo parādību var izskaidrot ar fona ietekmi, kas ir lielāka zemām koncentrācijām. Nepieciešams pievērst uzmanību jonam ar masu 204 Da, kura signāla intensitāte masspektūrā pieaug līdz ar koncentrāciju. Lielās koncentrācijas jonam ar masu 204 Da atbilst galvenā smaile. Jonu attiecības nenoteiktība samazinās, pieaugot koncentrācijai.

Tātad, nosakot levamisolu ar GH/MS metodi elektronu triecienu jonizācijas režīmā, jāņem vērā preparāta koncentrācija, t.i. nezināmās smailes masspekturu nepieciešams salīdzināt ar tuvākās koncentrācijas standartšķīduma masspekturu.

GH/MS mērījumiem pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā izvēlas jonus ar masu 127, 204, 205, 206 Da. To relatīvā intensitāte pret galveno smailli (205 Da) parādīta 2. tabulā.

2. tabula

Levamisola jonu relatīvā intensitāte masspektūrā GH/MS pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā ($n=3$)

Levamisola koncentrācija, $\mu\text{g/ml}$	Relatīvā intensitāte joniem ar m/z , %			
	127	204	205	206
0,5	4,9	4,6	100	13,0
1	3,4	3,8	100	14,9
1,5	4,5	4,2	100	13,4
2	3,3	3,7	100	15,4
2,5	4,2	4,2	100	13,6
3	4,6	4,4	100	12,5
3,5	4,4	4,3	100	12,7
4	4,3	4,3	100	12,6
4,5	3,9	4,0	100	13,6
5	4,0	4,2	100	12,9
Vidējā attiecība	4,1	4,2	100	13,5
Relatīvā standartnovirze, %	12	5,8	0	7,3

Rezultāti rāda, ka GH/MS mērījumiem ķīmiskās jonizācijas režīmā dažādu jonu relatīvās intensitātes atkarība no koncentrācijas ir krietni mazāka. To var izskaidrot ar mazāku fona ietekmi uz GH/MS pozitīvās ķīmiskās jonizācijas mērījumiem. Rezultātiem nenovēro tendenci samazināties vai paaugstināties

līdz ar koncentrācijas maiņu. Stabīlas jonu intensitātes attiecības ļauj droši veikt levamizola noteikšanas procedūras.

Rezultātu atkārtojamības un linearitātes pārbaude.

Mīnīmālā nosakāmā levamizola koncentrācija

Lai salīdzinātu gāzhromatogrāfijas – masspektrometrijas rezultātu atkārtojamību elektronu triecienu un pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā, hromatogrāfā atkārtoti ($n=5$) ievadīja levamizola standartšķīdumus ar koncentrāciju 1, 2 un 5 $\mu\text{g/ml}$. Rezultāti apkopoti 3. tabulā.

3. tabula

Levamizola GH/MS noteikšanas atkārtojamība elektronu triecienu un pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmos ($n=5$)

Levamizola koncentrācija, $\mu\text{g/ml}$	Relatīvās standartnovirzes hromatogrāfisko smaīļu augstumiem, %	
	elektronu triecienu jonizācijas režīms	pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīms
1	11,1	5,4
2	12,5	3,2
5	15,1	7,3

No rezultātiem (3. tab) var secināt, ka gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodei raksturīga samērā liela paralēlo mērījumu izkliede. Masspektrometrijā atkārtojamība atkarīga galvenokārt no jonizācijas procesu stabilitātes. Pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā iegūto datu labāka atkārtojamība, iespējams, ir saistīta ar šīs metodes augstāku jutību. Līdz ar to analītiskais signāls vienādām šķīduma koncentrācijām elektronu triecienu jonizācijas režīmā ir tuvāk noteikšanas robežai – rajonā, kur gadījuma novirzes ir lielākas.

Lai noteiktu ŠH/MS/MS metodes rezultātu atkārtojamību, tika izmantots levamizola standartšķīdums ar koncentrāciju 5 ng/ml . Relatīvā standartnovirze 5 atkārtotiem mērījumiem (smaīļu laukumiem) ir 6,8%. Ņemot vērā ļoti zemo šķīdumu koncentrāciju, var izdarīt secinājumu par ŠH/MS/MS mērījumu labāku atkārtojamību, salīdzinot ar GH/MS elektronu triecienu jonizācijas režīmā.

Gāzu hromatogrāfijas / elektronu triecienu jonizācijas masspektrometrijas rezultātu linearitātes pārbaude veikta, uzņemot hromatogrammas levamizola standartšķīdumiem ar koncentrāciju 1, 2, 5 un 10 $\mu\text{g/ml}$. Korelācijas koeficients R^2 lineārai kalibrēšanas taisnei, kas iegūta ar GH/MS metodi elektronu triecienu jonizācijas režīmā, ir 0,991, kas ir pietiekami labs rādītājs, ņemot vērā metodes atkārtojamību.

GH/MS pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmā iegūto kalibrēšanas grafiku koncentrāciju intervālam 0,5—5,0 $\mu\text{g/ml}$ vislabāk apraksta otrās kārtas polinoma vienādojums $y = 14009x^2 - 863,38x + 3922,2$. Korelācijas koeficients R^2 šajā gadījumā ir 0,993. Kalibrēšanas grafika nelincārais raksturs darba koncentrāciju diapazonā ir lielākais šīs levamizola noteikšanas metodes trūkums. Problēma atrisināma, veicot kalibrēšanu vairākām koncentrācijām un katru mērīšanas reizi pārbaudot līnijas stabilitāti. Aprēķinus var veikt, izmantojot otrās kārtas polinoma analītisko vienādojumu vai lineāro vienādojumu intervālam starp diviem tuvākiem kalibrēšanas grafika punktiem.

ŠH/MS/MS kalibrēšanas grafika konstruēšanai izmantoti standartšķīdumi ar koncentrācijām 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 ng/ml. Kalibrēšanas grafiks ir taisne ar korelācijas koeficientu $R^2 = 0,998$.

Minimālā nosakāmā levamizola koncentrācija noteikta no attiecības signāls / fons = 3. GH/MS mērījumos pamatlīnijas fona svārstības levamizola izdalīšanas laika intervālā gan elektronu triecienu, gan pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīmos ir 50 vienību robežās. Līdz ar to levamizola minimālā nosakāmā daudzuma hromatogrāfiskās smailes intensitāte ir 150 vienības. Minimālā nosakāmā levamizola daudzuma novērtēšanai izmanto formulu

$$C_{\min} = (h_{\text{fons}}/h_{\text{standarts}}) \times C_{\text{standarts}}$$

Lai pēc iespējas precīzāk novērtētu metodes jutību, nepieciešams izmantot zemākās koncentrācijas standartšķīduma mērījumu rezultātus. Lietojot šo formulu un kalibrēšanas grafiku datus, iegūst sekojošas minimālās nosakāmās levamizola koncentrācijas:

GH/MS ETJ režīmā: $C_{\min} = (150/1014) \times 1 = 0,14 \mu\text{g/ml} = 140 \text{ ng/ml}$;

GH/MS PĶJ režīmā: $C_{\min} = (150/8399) \times 0,5 = 0,0089 \mu\text{g/ml} = 8,9 \text{ ng/ml}$.

Ar ŠH/MS/MS minimālā nosakāmā koncentrācija

$$C_{\min} = (3/15,63) \times 1 \text{ ng/ml} = 0,19 \text{ ng/ml}.$$

Pārreķinot šo koncentrāciju uz levamizola saturu produktos, ja noteikšanu veic atbilstoši ieteiktajai metodei, iegūst šādas metodes jutības: GH/MS ETJ 1,9 $\mu\text{g/kg}$, GH/MS PĶJ 0,12 $\mu\text{g/kg}$, ŠH/MS/MS 0,0025 $\mu\text{g/kg}$. Literatūrā līdz šim norādītas šādas robežkoncentrācijas: 20 $\mu\text{g/kg}$ piena ar šķidrumu hromatogrāfijas metodi [4], 5 $\mu\text{g/kg}$ aknu ar GH/MS metodi ETJ režīmā [3], 1 $\mu\text{g/kg}$ piena ar GH un slāpekļa - fosfora selektīvo detektoru [1]. Šķidrumu hromatogrāfijas metodes jutība, lietojot UV detektoru, levamizola standartšķīdumam ir 170 ng/ml [9].

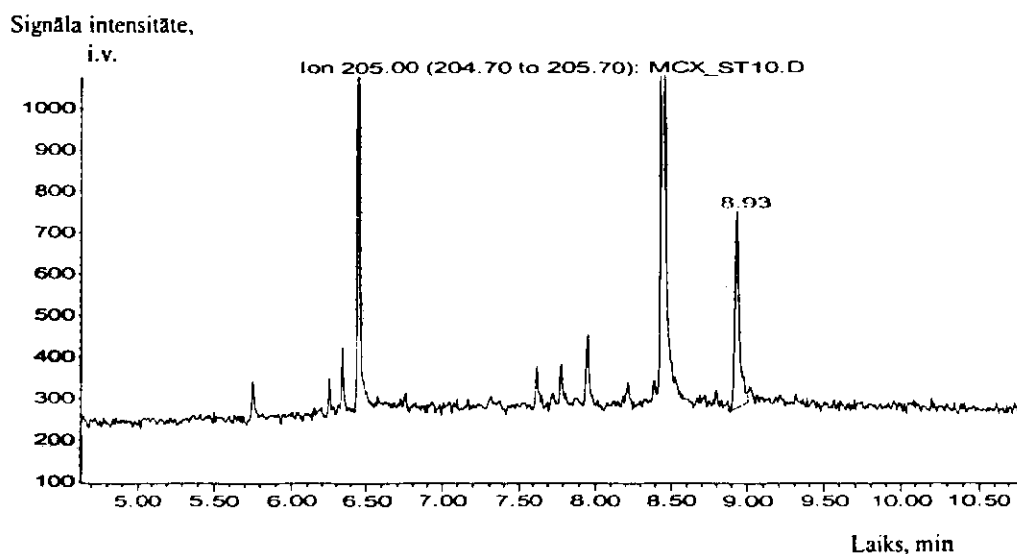
Levamizola paraugu sagatavošanas metožu izstrāde

Lai izstrādātu paraugu sagatavošanas metodi, kas būtu pielietojama pēc iespējas lielākam savienojumu skaitam, šajā pētījumā pārbaudītas universālās metodes: gelfiltrācijas hromatogrāfija un cietās fāzes ekstrakcija.

Gelfiltrācijas hromatogrāfija ļauj atdalīt savienojumus ar augstu molekulāro masu no mazmolekulāriem savienojumiem. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācija (frakciju tilpuma izvēle) veikta, izmantojot polihlorbifenilu (molekulāro masu diapazons 200—400 Da) maisījumu. Izvēloties frakciju tilpumu 24—49 ml, polihlorbifenilu desorbējamība (izdalīšanās no kolonnas) ir 90—95% robežās. Pielietojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju paraugu sagatavošanai, konstatēts, ka absolūtā desorbējamība ir tikai 62% ($n=5$). Levamizola zudumi ir saistīti ar tā adsorbciju uz stikla un vielas zudumiem, ietvaicējot paraugu. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas metodei ir raksturīga laba atkārtojamība (6,9% piecos mērījumos). Ņemot vērā to, ka, lietojot šo metodi panāk mazmolekulāro vielu atdalīšanu no traucējošām vielām, metodi var izmantot arī citu veterināro zāļu analīzei.

Cietās fāzes ekstrakcija ar *Oasis* MCX kolonnu ir pielietojama bāzisko savienojumu noteikšanai, jo šajā kolonnā ir sorbents ar apgrieztās fāzes un katjonu apmaiņas funkcionālām grupām. Šajā darbā pārbaudīta iespēja izmantot šīs kolonnas levamizola noteikšanai. Tika konstatēts, ka levamizola absolūtā desorbējamība no *Oasis* MCX kolonnas ir 71% un mērījumu atkārtojamība ir 10%

($n=3$). Metodei raksturīgs neliels reaģentu patēriņš, tā ir ātra un ērta izmantošanā, salīdzinot ar šķidrums – šķidrums ekstrakciju. Pateicoties sorbenta selektīvām īpašībām, *Oasis MCX* kolonnas efektīvi attīra paraugu no traucējošām vielām (2. att.).



2. att. Aknu paraugs ar levamizola standartpiedevu 10 ng/g pēc attīrīšanas ar *Oasis MCX* kolonnu.

Levamizols dzīvnieku izcelsmes produkcijā

Valsts veterināro zāļu atlikumdaudzumu kontroles programmas ietvaros levamizols tika noteikts 40 gaļas un 100 piena paraugos no dažādām Latvijas kautuvēm. Paraugi tika uzglabāti -18°C temperatūrā. Levamizola klātbūtne tika konstatēta septiņos paraugos — cūku un liellopu aknās. Pārējos paraugos levamizola saturs bija zem minimālās nosakāmās koncentrācijas. Vislielākā novērotā levamizola koncentrācija ir $20\ \mu\text{g}/\text{kg}$. Šī koncentrācija ir mazāka nekā maksimāli pieļaujamais levamizola saturs produktos, kas noteikts Eiropas Savienības valstīs ($100\ \mu\text{g}/\text{kg}$). No mūsu pētījuma rezultātiem var secināt, ka, tā kā levamizolu plaši pielieto Latvijā, ir nepieciešams turpināt šī veterināra preparāta satura kontroli dzīvnieku izcelsmes pārtikas produktos.

Secinājumi. 1. Izpētīta levamizola molekulas fragmentācija dažādos jonizācijas režimos. Levamizola fragmentācija pārsvarā notiek 2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b]tiazola gredzenā un ir stipri atkarīga no jonizācijas veida un enerģijas. Ņemot vērā levamizola molekulas fragmentu intensitāti masspektūrā, izvēlēti optimālie joni analīzei jonu monitoringa režīmā.

2. ŠH/MS/MS levamizola noteikšanas metodes optimālie parametri ir pārcejas $205\text{Da} \rightarrow 178\text{Da}$ skenēšana, potenciālu starpība uz konusa 35 V un sadursmju enerģija 22 eV. Levamizola noteikšanai optimālie ir joni ar masu 121, 148, 203, 204 Da GH/MS metodei ETJ režīmā un 127, 204, 205, 206 Da GH/MS metodei PĶJ režīmā.

3. Jonu intensitātes attiecības GH/MS PĶJ režīmā nav atkarīgas no levamizola koncentrācijas ($0,5\text{—}5\ \mu\text{g}/\text{ml}$). Veicot levamizola pierādīšanu ar GH/MS ETJ režīmā, jāņem vērā levamizola koncentrācija.

4. ŠH/MS/MS un GH/MS PĶJ mērījumu relatīvās standartnovirzes ir no 3 līdz 8%. GH/MS mērījumiem ETJ režīmā ir sliktāka atkārtotamība. GH/MS

metode PĶJ režīmā ļauj uzlabot levamizola noteikšanas jutību no 140 ng/ml (GH/MS ETJ) līdz 8,9 ng/ml. ŠH/MS/MS metode raksturojas ar augstāko līdz šim literatūrā aprakstīto jutību — levamizola minimālā nosakāmā koncentrācija ir 0,19 ng/ml.

5. Izstrādātas jaunas paraugu sagatavošanas metodes, izmantojot cietās fāzes ekstrakciju un gelfiltrācijas hromatogrāfiju. Šīs procedūras ir iespējams automatizēt un pielietot arī citu veterināro zāļu analīzēm.

6. Levamizola klātbūtne tika konstatēta septiņos no 140 pārbaudītiem aknu paraugiem. Vislielākā novērotā levamizola koncentrācija ir 20 µg/kg.

L I T E R A T Ū R A

1. Schenck F.J., Podhorniak L.V., Wagner R. Food Addit. Contam., 1998, 15, 4, 411.
2. Woestenborghs R., Michielsens L., Heykants J. J. Chromatogr., 1981, 224, 25.
3. Heitzman R.J. Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: Reference materials and methods. Blackwell scientific publications, Oxford, 1994.
4. Osterdahl B-G., Johnsson H., Nordlander I. J. Chromatogr., 1985, 337, 151.
5. Chappell C.G., Creaser C.S., Shepherd M.J. J. Chromatogr., 1992, 626, 223.
6. Cherlet M., De Baere S., Croubels S., De Backer P. J. Chromatogr., 2000, 742, 2, 283.
7. Gaillard Y., Pepin G. J. Chromatogr., 1997, 762, 1, 251.
8. McLafferty F.W., Turecek F. Interpretation of mass spectra. 4th edition. University science books, Sausalito, California, 1993.
9. Rojas J.H., Guevara R., Leiva L. Rev. Colomb. Cienc. Quim.-Farm., 1997, 26, 27; C.A., 1999, 128, 53341e.

V. Bartkevičs, G. Kučkovska, J. Ģibietis

ANALYSIS OF LEVAMISOLE RESIDUAL AMOUNTS IN FOOD USING GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY, GC/MS IN PCI MODE AND LC/MS/MS

S U M M A R Y

This publication is dealing with determination of levamisole residual amounts in animal origin products with chromatographic and mass spectrometric methods. Mass spectra of levamisole obtained using different ionization methods (EI, PCI, NCI, electrospray) and possible levamisole fragmentation patterns are considered. Optimization of analytical methods for detection of levamisole is performed with regard to achieve the highest sensitivity level of analysis. Main characteristics of the GC/MS EI, PCI and LC/MS/MS methods (linearity, reproducibility) were compared. Possibility of using of gel permeation chromatography and *Oasis* MCX solid phase extraction procedures for the sample clean-up is described. The presence of levamisole in 7 liver samples (from 140 samples tested) was established. The found concentrations of this potential harmful compound were below the maximum allowed content.

В. Баргкевич, Г. Кучковская, Я. Гибнетис

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ЛЕВАМИЗОЛА В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДАМИ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

РЕЗЮМЕ

Данная публикация посвящена определению остаточных количеств левамизола в продуктах животного происхождения методами хро-

мато-масс-спектрометрии. Рассмотрена фрагментация левамизола при различных режимах ионизации. Проведена оптимизация условий аналитического метода определения левамизола с целью улучшения чувствительности анализа. Сравнены основные параметры методов газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Описана возможность применения гель-фильтрационной хроматографии и твердофазной экстракции для очистки образца. Наличие левамизола подтверждено в 7 образцах печени из 140 проверенных образцов.

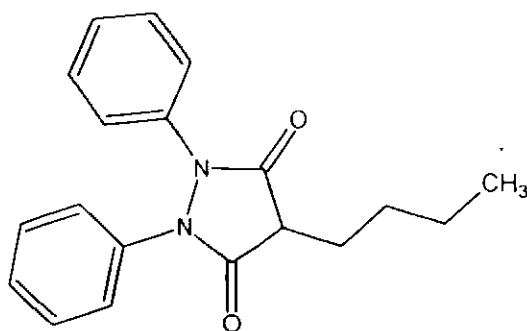
Iesniegts 18.01.2002

V. Bartkevičs, J. Ģībietis

DETERMINATION OF RESIDUAL PHENYLBUTAZONE IN FOOD PRODUCTS USING GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY

*State Veterinary Medicine Diagnostic Center,
University of Latvia*

Phenylbutazone (PBZ) is a drug of the pyrazolone group related to the nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAID).

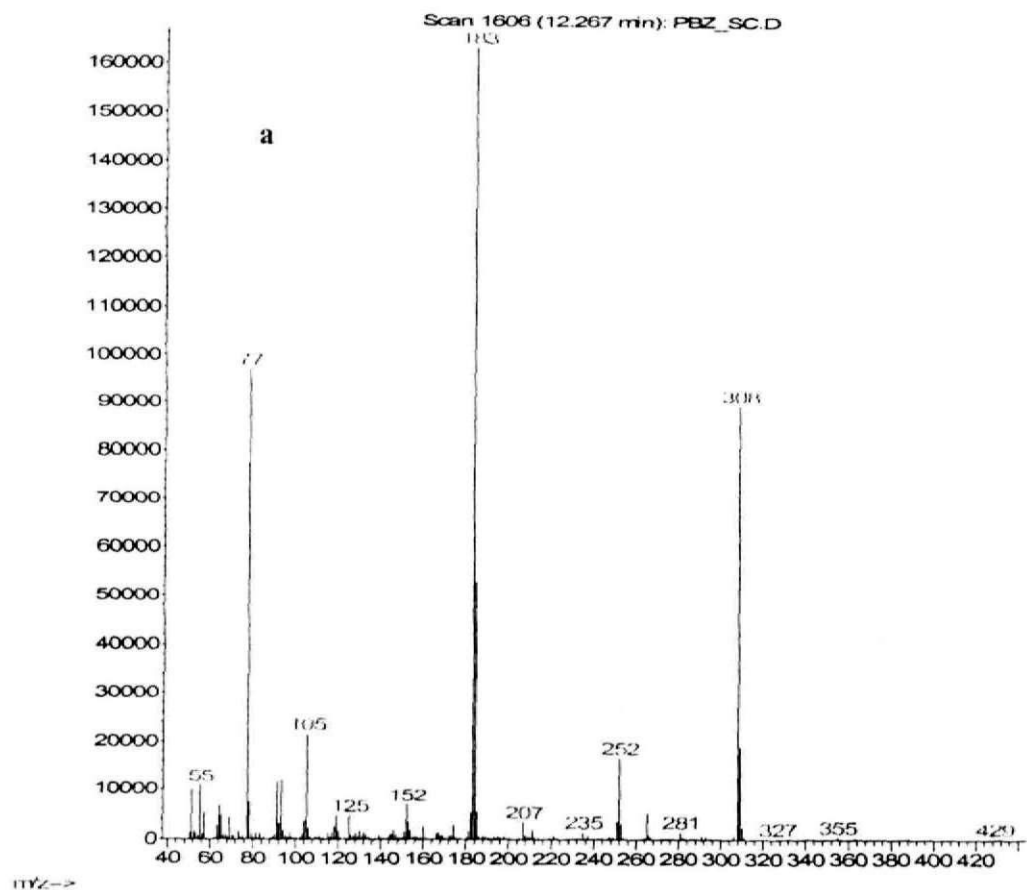


These drugs possess antifever, antirheumatic and antiinflammatory activity. According to the literature data, 93% of veterinarians use nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of animals, 60% of veterinarians apply medicine more than once per week [1]. Taking into account the long elimination half-life of drug in animals (in plasma -- from 30 to 80 h) a high possibility of occurrence of phenylbutazone residues in animal origin food products exists. The residues of this medicine exhibit serious harm for human health because of possibilities to cause an aplastic anemia or some allergic reactions even at very low exposure levels.

Taking into account the toxicity of phenylbutazone there exists an actual need to elaborate a sensitive and reliable method for determination of residual quantities of phenylbutazone in food products — meat and milk. High-performance liquid chromatography with UV-detection is widely used for determination of phenylbutazone [2, 3]. Gas chromatography with mass-spectrometric detection has been used for confirmation of results [4, 5]. Urine or serum samples are tested for the drug, and detection limits vary from 500 ng/ml [3, 4] to 35 [2] and 20- -50 ng/ml [5, 6].

In order to apply the elaborated analytical method for the control of animal origin food products it is necessary to improve sensitivity of the method (at least up to 5 ng/ml (ng/g)). Gas chromatographic mass-spectrometric (GC MS) determination of drug preceded by sample preparation using liquid – liquid extraction is proposed in this paper. The fragmentation of phenylbutazone using different ionization modes and different derivatization paths is evaluated. Different characteristics of the analytical method, such as linearity, reproducibility, precision and detection limit are checked.

Abundance, i.u.



Abundance, i.u.

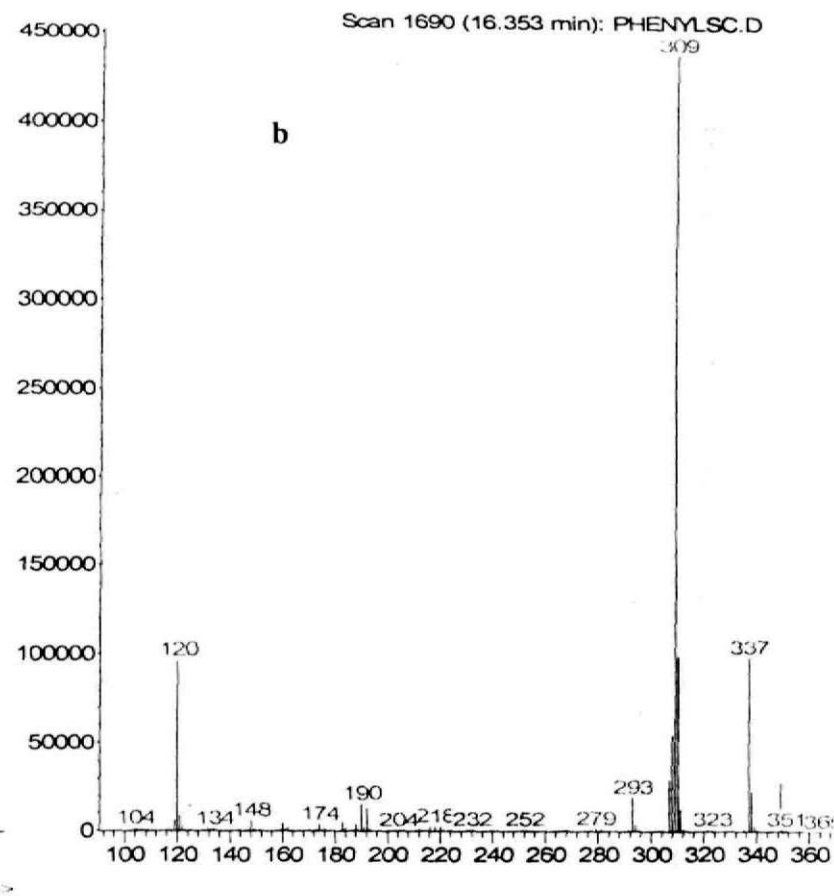


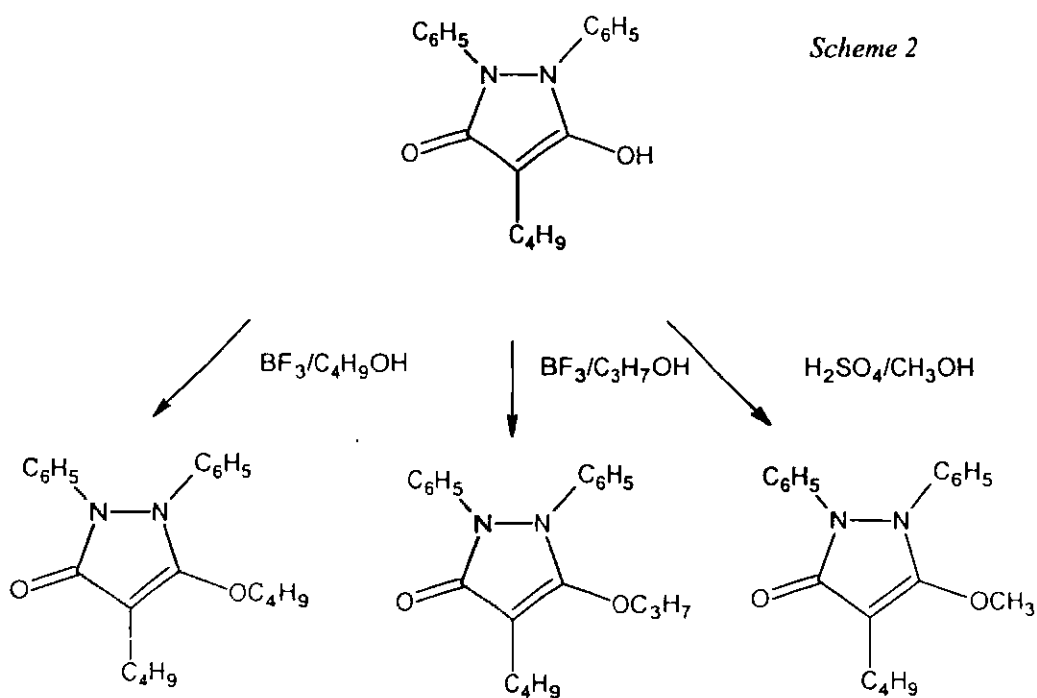
Fig. 1. Mass spectrum of phenylbutazone obtained by GC-MS from a pure solution a) electron impact ionization mode; b) positive ion chemical ionization

ionization mode. The structures of the main ion fragments and the possible paths of fragmentation observed applying this ionization mode are shown in Scheme 1.

Based on the intensity of peaks in mass spectra the ions with masses of 183, 256, 308 and 309 Da were chosen for analysis in the electron impact ionization mode and ions with masses of 120, 309, 337 and 349 Da — for analysis in the positive ion chemical ionization mode.

Phenylbutazone derivatization studies

Although the properties of phenylbutazone molecule allow performing a direct analysis by the gas chromatography, derivatization studies were performed in order to evaluate the possibilities to elaborate multi-residue methods for simultaneous determination of phenylbutazone and other compounds from the NSAID group (diclofenac, ketoprofen, naproxen, piroxicam). These acidic compounds should undergo derivatization prior to the gas chromatographic analysis. Silylation with bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), methylation with a methanol – sulfuric acid solution, propylation with $\text{BF}_3 / \text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ and butylation with $\text{BF}_3 / \text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ were chosen. Possible derivatization reactions are shown in Scheme 2.



The experiment shows that no reaction occurs using the silylating reagent. Gas chromatographic analysis of mixture from methylation reaction reveals the presence of methylated and unchanged phenylbutazone (chromatographic peak area ratio $\text{CH}_3\text{-PBZ} / \text{PBZ} = 1.7$). Consequently, the peak area ratio for $\text{C}_3\text{H}_7\text{-PBZ}$ and unchanged PBZ is 0.38 and that of $\text{C}_4\text{H}_9\text{-PBZ}$ to unchanged phenylbutazone is 0.27. The obtained results show that derivatization reaction proceeds less efficiently with increasing the length of alkyl chain. The steric factors determine the absence of analytical use of propylation and butylation reactions. Use of bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide leaving phenylbutazone molecule

intact or methylation after optimization of reaction conditions reveals the possibilities to elaborate a multi-residue method for determination of some other NSAID group compounds.

Choice of solvents for extraction and selectivity of the method

The feature of phenylbutazone molecules to distribute differently between the organic and water phases at different pH is used in the elaboration of a sample preparation method for the determination of phenylbutazone. Hexane, ethyl acetate and dichloromethane were tested for these procedures. Hexane was found to be the most appropriate solvent for extraction of interfering compounds (mostly fat) from alkalified water phase, and dichloromethane — for extraction of phenylbutazone from acidified water phase.

Selectivity of the elaborated method is demonstrated in Fig. 2.

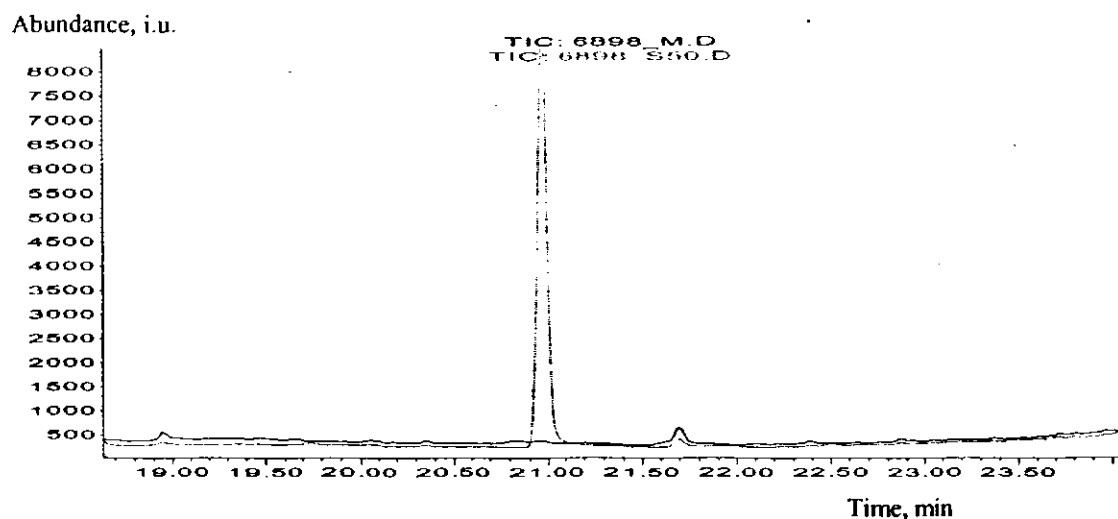


Fig. 2. Chromatogram of spiked meat sample containing 50 ng/g of phenylbutazone overlaid on chromatogram of blank meat sample

Linearity and sensitivity of the method

The GC-MS analysis of standard solutions of phenylbutazone in concentration range 10—1000 ng/ml reveals good correlation between the peak height and phenylbutazone concentration ($R^2 = 0.998$). The detection limit of phenylbutazone in standard solutions using electron impact ionization mode is 10 ng/ml (calculated from signal-to-noise ratio of 20 ng/ml PBZ solution). GC-MS measurements performed using the positive chemical ionization mode showed that this mode is 5 times less sensitive, so only electron impact ionization was employed in further experiments.

Calibration on matrix showed good linearity for samples containing phenylbutazone in concentrations of 5, 10, 20, 25 and 50 ng/g ($R^2 = 0.998$). Absolute recovery for contamination level of 50 ng/g was 79.7%. Sensitivity of method is demonstrated by analyzing samples containing phenylbutazone in low concentrations (Fig. 3).

Intensity of phenylbutazone peak on chromatogram of sample of meat spiked with phenylbutazone at concentration of 5 ng/g and signal-to-noise ratio shows that the detection limit 1 ng/g is characteristic for the proposed method.

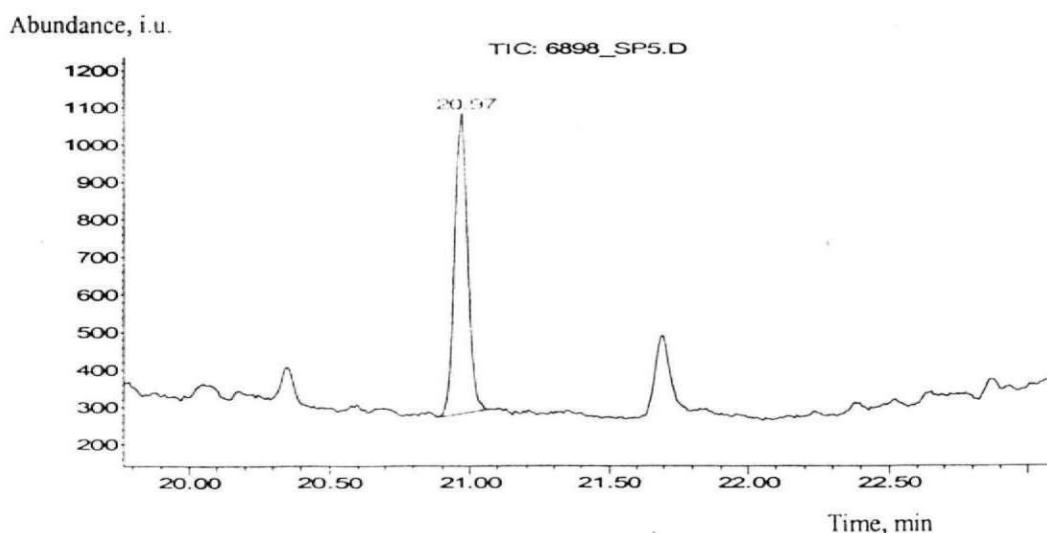


Fig. 3. Chromatogram of spiked meat sample (PBZ concentration 5 ng/g)

Confirmation of presence of phenylbutazone residual amounts

In order to check the possibility to confirm the presence of phenylbutazone in animal origin food products the ratios of different ions at different residual drug concentrations were measured. Results are summarized in Table.

Ratio of ions used for the selected ion monitoring GC-MS

Phenylbutazone content, ng/g	Relative abundance of ions, %			
	183 Da	252 Da	308 Da	309 Da
5	54.0	9.9	27.2	8.8
10	54.3	9.9	26.9	8.9
20	58.1	6.8	28.3	6.8
25	58.0	6.4	28.8	6.8
50	56.9	6.2	30.1	6.8
Average abundance of ions, %	56.3	7.9	28.3	7.6
Relative standard deviation (RSD)	3.5%	24.3%	4.5%	14.7%
Maximum permitted RSD for variation of ion abundance	± 10%	± 50%	± 15%	± 50%

As follows from the Table, variations of intensity ratio of different ions in mass spectrum are not significant. Relative standard deviations of ion intensities comply with the limits set in EC decision No. 2002/657/EC. Thus the proposed method could be successfully used for confirmation of presence of phenylbutazone residual amounts in natural products. Importance of this method parameter is emphasized by the fact that in many countries PBZ residue level in food has zero tolerance.

Conclusions. 1. Pattern of the fragmentation of phenylbutazone molecule under different ionization modes is proposed and optimal ions for GC-MS analysis in the selected ion monitoring mode are chosen.

2. Derivatization studies of phenylbutazone molecule are performed in order to elaborate a multi-method for the determination of nonsteroidal antiinflam-

matory drugs. The methylation reaction gives the best yield of derivatives amenable for gas chromatography.

3. The elaborated GC-MS method for the determination of phenylbutazone is selective, linear, stable, sensitive (limit of detection 1 ng/g) and applicable for the control of animal origin products on presence of phenylbutazone residual amounts. Stability of different ion ratio makes this method reliable for use for confirmation of presence of residual amounts of phenylbutazone.

REFERENCES

1. *Kopcha M., Kaneene J.B., Shea M.E.* J. Am. Vet. Med. Assoc., 1992, **201**, 1868.
2. *Bakkali A., Corta E., Berrueta L.A., Gallo B.* J. Chromatogr., 1999, **729**, 139.
3. *Grippa E., Santini L., Castellano G., Gatto M.T., Leone M.G., Saso L.* J. Chromatogr., 2000, **738**, 1, 17.
4. *Neto L.M., Andraus M.H., Salvadori M.C.* J. Chromatogr., 1996, **678**, 2, 211.
5. *Singh A.K., Jang Y., Mishra U., Granley K.* J. Chromatogr., 1991, **568**, 2, 351.
6. *Murinaka T., Shibata T., Minami Y., Umeno Y.* J. Chromatogr., 1980, **183**, 3, 331.
7. *McLafferty F.W., Turecek F.* Interpretation of mass spectra. 4th edition. University science books, Sausalito, California, 1993.

V. Bartkevičs, J. Ģībietis

FENILBUTAZONA ATLIKUMDAUDZUMU NOTEIKŠANA DZĪVNIĒKU IZCELSMES PRODUKTOS AR GĀZU HROMATOGRĀFIJU – MASSPEKTROMETRIJU

KOPSAVILKUMS

Publikācija veltīta fenilbutazona atlikumdaudzumu noteikšanas metodes izstrādei ar gāzu hromatogrāfiju – masspektrometriju. Piedāvāta fenilbutazona fragmentācijas shēma dažādos jonizācijas režīmos. Izskatīta iespēja veikt fenilbutazona derivatizāciju, izmantojot sililējošus un alkilējošus reagentus. Izstrādāta šķidrums – šķidrums ekstrakcijas paraugu sagatavošanas metode. Veikta izstrādātās metodes analītisko parametru pārbaude.

В. Барткевич, Я. Гибиецис

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ФЕНИЛБУТАЗОНА В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТО – МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

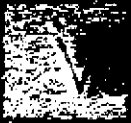
РЕЗЮМЕ

Данная публикация посвящена разработке метода определения остаточных количеств фенилбутазона в продуктах животного происхождения методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Предложена схема фрагментации фенилбутазона и рассмотрены варианты использования дериватизации для анализа методом газовой хроматографии. Описан метод для очистки биологического образца с использованием жидкостно – жидкостной экстракции. Разработанный метод применен для контроля остаточных количеств фенилбутазона в продуктах животного происхождения.

Iesniegts 29.04.2003

ISSN 1407-0944

Baltic Journal of Laboratory Animal Science



48th PATHOLOGY OF LABORATORY ANIMALS (POLA)

5-8 August 2003

Doubletree Hotel

Rockville, Maryland

Register on-line: <http://www.afip.org/Departments/edu/upcoming.htm>

Course description. This course is designed primarily for veterinarians and other allied scientists who are responsible for the recognition and interpretation of lesions in laboratory animals. It is intended to help attendees interpret spontaneous diseases which might affect experimental results, or alter the health of laboratory animals. Pathology will receive major emphasis in the course, but other features of diseases such as etiology, diagnosis, and control will also be given attention. The course will encompass a wide range of diseases including infectious, neoplastic, iatrogenic, nutritional, and metabolic conditions in a variety of laboratory animal species.

Course objective. The major objective of this course is to review the pathology and where appropriate, the etiology, pathogenesis, diagnosis and control of infectious, neoplastic, iatrogenic, nutritional, and metabolic diseases of laboratory animals. At the completion of this course, attendees will be able to better recognize and interpret conditions which may affect experimental results or alter the health of laboratory animals.

INFORMATION

For further information please contact:

Course Coordinator: Mark L. Hovland

Department of Medical Education

Armed Forces Institute of Pathology

Washington, DC 20306-6000

Tel: (202) 782-2637

Toll Free Tel: (800) 577-3749 (within the U.S.)

Fax: (202) 782-5020

Toll Free Fax: (800) 441-0094

DSN: 662-2637 Email: came@afip.osd.mil

Formerly: Laboratornyye Zhyvotnye

CONTENTS

СОДЕРЖАНИЕ

LIBRARY
LATVIAS AKADEMIŠKA BIBLIOTĒKA
dib.
1524.9

ORIGINAL ARTICLES

Riso, E.-M., Ahtikoski, A. M., Umnova, M., Kaasik, P., Alev, K., Seene, T., Takala, T. Partial prevention of muscle atrophy in excessive level of glucocorticoids by exercise: effect on contractile proteins and extracellular matrix 5

Berzina, N., Smirnova, G., Titaev, V., Bartkevichs, V., Buda, I. Chickens as an animal model for the investigation of pharmacokinetics of injection formulations (In Russian) 13

Agrba, V. Z., Lapin, B. A., Mezentseva, M. V., Ershov, F. I., Medvedeva, N. M., Kosukhina, N. V., Karal-ogly, D. D. Interferon state and B- and T-lymphocyte count in healthy *Macaca mulatta* of different age (In Russian) 19

SHORT COMMUNICATION

Verner, A. I. The device for biological liquids collection from small laboratory animals in experiment (In Russian) 26

EDUCATION

Shmidt, E. F. Genetic quality control of laboratory mice by the mandible shape analysis (In Russian) 29

ADVERTISEMENTS 35

BOOK REVIEW 38

EVENTS 40

INFORMATION 41

CONTENTS OF OTHER JOURNALS ON LABORATORY ANIMAL SCIENCE 44

NOTES TO AUTHORS 58

SUBSCRIPTION INFORMATION 64

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Рисо Э.-М., Ахтикоски А. М., Умнова М., Каасик П., Алев К., Сэне Т., Такала Т. Профилактическое влияние упражнений на атрофию мышц при экстремальных дозах глюкокортикоидов: влияние на сократительные белки и внеклеточный матрикс (Англ.) 5

Берзиня Н., Смирнова Г., Титаев В., Барткевичс В., Буля И. Цыплята как модель для исследования фармакокинетики инъекционных препаратов 13

Агрба В. З., Лапин Б. А., Мезенцева М. В., Еришов Ф. И., Медведева Н. М., Косухина Н. В., Карал-оглы Д. Д. Интерфероновый статус и содержание В- и Т-лимфоцитов у клинически здоровых макаков резусов (*Macaca mulatta*) разного возраста 19

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

Вернер А. И. Устройство для забора биологических жидкостей у мелких лабораторных животных в эксперименте 26

ОБРАЗОВАНИЕ

Шмидт Е. Ф. Контроль генетической стандартности лабораторных мышей методом мандибулярного анализа 29

РЕКЛАМА 35

КНИЖНОЕ ОБОЗРЕНИЕ 38

КАЛЕНДАРЬ СОБЫТИЙ 40

ИНФОРМАЦИЯ 41

СОДЕРЖАНИЕ ДРУГИХ ЖУРНАЛОВ ПО НАУКЕ О ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ 44

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ 58

УСЛОВИЯ ПОДПИСКИ 64

"Baltic Journal of Laboratory Animal Science" is cited by "Referativnyi Zhurnal" (Russia), "ICLAS News", "Chemical Abstracts"; is included in the BIOSIS database, CAB ABSTRACTS, Current Veterinary Serials <http://www.medvet.umontreal.ca/biblio/vetj.html> <http://vip.latnet.lv/journalLAS/>

17. *Seene, T., Alev, K.* Effect of glucocorticoids on the turnover rate of actin and myosin heavy and light chains on different types of skeletal muscle fibers // *J. Steroid Biochem.* 1985, **22**(6), 767-771.
18. *Seene, T., Alev, K.* Effect of muscular activity on the turnover rate of actin and myosin heavy and light chain in different types of skeletal muscle // *Int. J. Sport Med.* 1991, **12**(2), 204-207.
19. *Seene, T., Umnova, M.* Relations between the changes in the turnover rate of contractile proteins, activation of satellite cells and ultra-structural response of neuromuscular junctions in the fast-oxidative-glycolytic muscle fibres in endurance trained rats // *J. Basic Appl. Myol.* 1992, **2**(1), 39-46.
20. *Seene, T., Umnova, M., Alev, K., Fehme, A.* Effect of glucocorticoids on contractile apparatus of rat skeletal muscle // *J. Steroid Biochem.* 1988, **29**, 313-317.
21. *Seene, T., Umnova, M., Kaasik, P.* The exercise myopathy // *Overload, Performance Incompetence and Regeneration in Sport* / Ed. M. Lehmann, C. Foster, U. Gastmann, H. Keizer, J. Steinacker. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999, 119-130.

Received June 4, 2002



P.O.Box 2170
5001 CD Tilburg
The Netherlands

Tel: + 31 13 4555189
Fax: + 31 13 4550175
E-mail: hartelust.bv@consunet.nl

Macaca fascicularis
Macaca mulatta

Beagle dogs available per 2001

Bred for research purposes only.
Can be tested for most diseases, viruses etc.
Quarantined before shipment to your firm.
All official documents are supplied with delivery.
Exact prices and terms upon your request.

ЦЫПЛЯТА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ИНЪЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ

N. Берзина, Г. Смирнова, В. Титаев, В. Барткевичс*, И. Буля***

Институт биологии Латвийского университета, Саласпилс

*Государственный центр ветеринарно-медицинской диагностики Продовольственной и ветеринарной службы Латвийской Республики, Рига

**АО Кальцекс, Рига, Латвия

Произведена оценка пригодности цыплят в качестве модели для исследования фармакокинетических параметров инъекционных препаратов, выявлены сходство и различия фармакокинетики фентанила в организме крыс и цыплят. Фентанил (АО Кальцекс, Латвия) вводили животным подкожно в дозе 100 мкг/кг. Динамику содержания неизмененного фентанила в плазме крови через определенные промежутки времени определяли модифицированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Согласно полученным данным, после введения крысам и цыплятам фентанила в одинаковых молярных количествах основные фармакокинетические параметры препарата (AUC_{0-t} , T_{max} , C_{max} , Cl_r) у двух видов исследованных животных имели близкие величины, что свидетельствует о возможности использования цыплят в качестве модели наряду с грызунами.

Ключевые слова: *фентанил, фармакокинетика, модель на животных, цыплята, крысы*

CHICKENS AS AN ANIMAL MODEL FOR THE INVESTIGATION OF PHARMACOKINETICS OF INJECTION FORMULATIONS

N. Berzina, G. Smirnova, V. Titaev, V. Bartkevichs*, I. Bula***

Institute of Biology of Latvian University, Salaspils

*Republic of Latvia Food and Veterinary Service State Veterinary Medicine Diagnostic Centre, Riga

**JSC Kalceks, Riga, Latvia

The aim of this work was to assess the suitability of the chickens as an animal model for investigation of the pharmacokinetics of injection formulations, to determine the similarities and variations of the pharmacokinetics of fentanyl in rats and chickens. Fentanyl produced by JSC Kalceks (Latvia) was administered subcutaneously at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The dynamics of concentration of unalterable fentanyl in plasma in a definite time periods were determined by HPLC in combination with tandem mass spectrometry method. Our data demonstrated that basic pharmacokinetic parameters of fentanyl (AUC_{0-t} , T_{max} , C_{max} , Cl_r) in rats and chickens are in close agreement. These results indicate that the chickens would be used as a suitable animal model for the study of pharmacokinetics of injection formulations.

Key words: *fentanyl, pharmacokinetics, animal model, chickens, rats*

В качестве моделей для научных исследований используются различные виды животных [1, 3, 6, 11], в том числе и птицы, в механизме основных процессов обмена которых, несмотря на

ряд специфических особенностей, имеется много общего с млекопитающими. Наиболее широкое применение в лабораторных условиях нашли домашние птицы, главным образом куры,

в меньшей степени – индейки и перепела [1, 4]. Чаще всего птицы являются объектом исследований в области сравнительной физиологии и при изучении метаболических процессов, что связано с присущей им высокой интенсивностью обмена. Куры и индюки используются также для получения биологического материала (тканей и антител), проведения токсикологических процедур, оценки безопасности и эффективности фармацевтических препаратов, а также для тестирования безопасности сельскохозяйственной продукции [4]. В последнее время все большее количество сельскохозяйственных животных, в том числе цыплят, используется в качестве модели в доклинических испытаниях и при фармацевтической оценке препаратов. Задача данного исследования – сравнение основных фармакокинетических параметров фентанила на двух моделях: крысах, традиционно используемых в подобных экспериментах, и цыплятах.

Для широко применяемых в клинической практике синтетических опиатов, к числу которых относится фентанил, характерны существенные различия в фармакокинетике и фармакодинамике [10]. Проблема надежности используемых методов количественного определения ряда опиатов в биологических образцах остается актуальной и в настоящее время. Для клинических исследований фентанила наиболее часто применяется радиоммунийный метод [10], который характеризуется высокой чувствительностью (200 пг/мл плазмы крови) и относительной специфичностью, обусловленной присутствием в крови метаболитов препарата или других веществ, близких по структуре к анализируемому. Методы газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором являются одними из самых избирательных и чувствительных (20–50 пг/мл плазмы крови) для изучения фармакокинетики фентанила [5, 9]. Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения фентанила в плазме крови с использованием УФ-детектора при длине волны 195–200 нм требуют длительной и тщательной очистки образца [7, 8, 12]. В последние годы значительный прогресс достигнут благодаря

применению нового поколения инструментальной техники. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС) является идеальным для анализа фентанила в сложных биологических матрицах [13]. Таким образом, с методической точки зрения цель настоящего исследования заключалась в воспроизведении метода тандемной масс-спектрометрии с ионизацией в электроспрее для определения неизмененного фентанила в плазме крови испытуемых животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЖИВОТНЫЕ

В качестве модели были выбраны половозрелые крысы обоего пола массой 150–200 г в возрасте 2 мес. Животных содержали в открытой системе по 6 особей в клетке (*Velaz*, Чехия). В качестве подстилки использовали опилки. Температура окружающей среды составляла 25 °С. Длительность периода привыкания к условиям содержания – 1 сут. Крысы имели свободный доступ к гранулированному корму (ПАО *Гриндекс*, Латвия) и водопроводной воде. Для сравнительного изучения фармакокинетики фентанила в качестве второй модели были выбраны цыплята породы *Lohman Brown* массой 350 г в 30-дневном возрасте. Цыплят содержали в батарейных клетках со свободным доступом к корму и воде.

ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТА И ЗАБОР ОБРАЗЦОВ КРОВИ

Препарат фентанила (0,005% для инъекций) производства АО *Кальцекс* (Латвия) животным вводили подкожно в однократной дозе 100 мкг/кг. Содержание фентанила в плазме крови определяли через 5, 15, 30, 60, 120, 240 и 300 мин (у крыс) и через 5, 15, 30, 60 и 120 мин (у цыплят) после его введения ($n=3$). Кровь забирала в пробирки с гепарином: у крыс из подязычной артерии, у цыплят – из сонной артерии. Образцы крови центрифугировали в течение 10 мин при 3 000 об/мин. Плазму крови до проведения анализа хранили при –20 °С.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНТАНИЛА В ОБРАЗЦАХ ПЛАЗМЫ

Определение неизмененного фентанила в плазме крови проводили методом ВЭЖХ/МС. Данный аналитический метод является результатом незначительной модификации валидированного метода [13]: в процессе подготовки проб вместо автоматической системы для твердофазной экстракции (ТФЭ) на 96-луночных платах применяется обычная 12-позиционная вакуумная камера ТФЭ. Для анализа использовали 500 мкл плазмы крови.

Для очистки образцов от эндогенных компонентов плазмы применяли патентованные патроны (30 мг) фирмы *Waters Oasis®/МСХ*, США, представляющие собой смесь липофильно-гидрофильного сополимера с сильным катионообменным сорбентом.

Стандартные растворы. Из основного раствора фентанила в метаноле (1 мг/мл) готовили рабочие растворы с концентрациями 5, 50, 250, 1000 и 5 000 нг/мл.

Калибровочная кривая. К плазме крови (500 мкл) добавляли стандартные рабочие растворы фентанила (10–25 мкл) для построения калибровочной кривой со следующими концентрациями препарата: 0,2; 2; 10; 50 и 150 нг/мл плазмы крови.

Подготовка образца для анализа. Перед проведением анализа образцы плазмы крови размораживали при комнатной температуре, затем центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. В 500 мкл плазмы вносили 10 мкл концентрированной фосфорной кислоты и встряхивали 30 с.

Схема ТФЭ. Патроны устанавливали в вакуумную камеру для ТФЭ и активировали сорбент 1 мл метанола, затем 1 мл деионизированной воды. В патрон вносили 500 мкл лоджисленного образца плазмы и 2 мин выдерживали под вакуумом при 4 бар. Для очистки образца сорбент промывали 1 мл 0,1 н раствора соляной кислоты, а затем – 1 мл метанола под вакуумом при 10 бар. Фентанил элюировали 2 мл смеси метанола и 5%-го раствора аммония гидроксида (95/5, об./об.) под вакуумом при 4 бар.

Элюат упаривали досуха на водяной бане при 40 °С в токе азота. Остаток растворяли в 100 мкл метанола, затем 10 мкл вводили в хроматографическую колонку.

Аналитическое оборудование. Исследование проводили на настольном tandem-квадрупольном хромато-масс-спектрометре QUATTRO LC (*Micromass*, Великобритания), совмещенным с сепарационным модулем Alliance 2690 (*Waters*, США). Для хроматографического разделения использовали колонку XTerra MS C18 3,5 мкм и 2,1×100 мм (*Waters*) при скорости потока 0,2 мл/мин.

Регистрация и обработка данных. Масс-спектры родительского с m/z 337 и дочерних ионов с m/z 105, 132 и 188 регистрировали в режиме электроспрея. Детектирование неизмененного фентанила в образцах плазмы проводили при трех дочерних ионах одновременно. Масс-спектры и хроматограммы образцов представлены на рис. 1–3. Калибровочная кривая в диапазоне концентраций 0,2–150,0 нг/мл плазмы является линейной. Коэффициент определения 0,999. Предел обнаружения метода составил 50 нг/мл плазмы. Регистрацию и обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Masslynx 3.5.

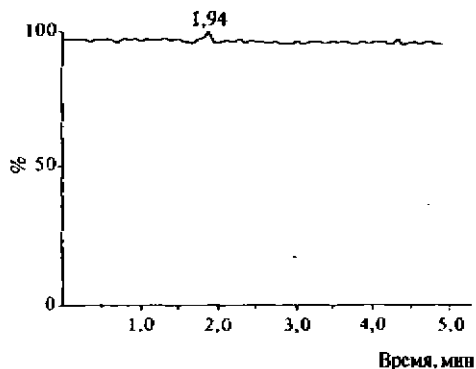


Рис. 1. Хроматограмма контрольного образца плазмы крови цыпленка

Fig. 1. Chromatogram of blank chicken blood plasma

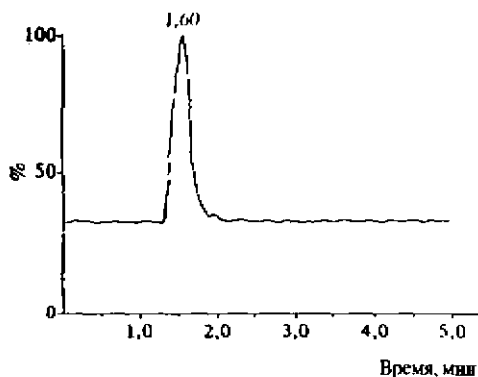


Рис. 2. Хроматограмма контрольного образца плазмы крови цыплят с добавкой фентанила в концентрации 25 нг/мл
 Fig. 2. Chromatogram of chicken blood plasma spiked with 25 ng/ml of fentanyl

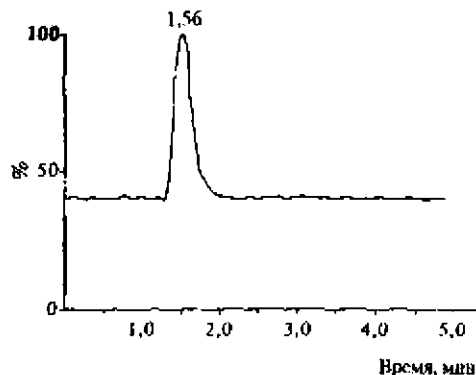


Рис. 3. Хроматограмма опытного образца плазмы крови цыплят через 15 мин после однократного подкожного введения фентанила в дозе 100 мкг/кг
 Fig. 3. Chromatogram of chicken blood plasma within 15 min after single subcutaneous administration of fentanyl at a dose of 100 µg/kg

Анализ фармакокинетических параметров. Индивидуальные и средние значения фармакокинетических параметров для крыс ($n=3$) и

цыплят ($n=3$) рассчитывали на основании полученных кривых «концентрация–время» после однократного подкожного введения фентанила в дозе 100 мкг/кг. Для оценки сходства и различий кинетики фентанила в плазме крови двух видов животных использовали следующие немодельные фармакокинетические параметры [2]:

- максимальная концентрация в плазме (C_{max});
- время достижения максимальной концентрации (T_{max});
- площадь под кривой «концентрация–время» ($AUC_{0-\infty}$), рассчитанная методом трапеций;
- период полужизни ($T_{1/2}$), рассчитанный методом линейной регрессии;
- площадь под фармакокинетической кривой, экстраполированная до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), рассчитанная методом экстраполяции терминального участка кривой;
- общий объем распределения (V_d);
- общий клиренс (Cl).

Все фармакокинетические параметры подвергались математической обработке с использованием t -теста ($P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средние значения концентрации фентанила в плазме крови крыс и цыплят после однократного подкожного введения препарата (табл. 1) были использованы для определения основных фармакокинетических параметров. Изучение динамики концентрации препарата у животных двух видов (табл. 2) показали, что фентанил быстро всасывается в кровь, достигая максимальной концентрации в течение 5–15 мин. Среднее значение параметра C_{max} у крыс (39,02 нг/мл) по сравнению с цыплятами (28,97 нг/мл) характеризуется высокой внутривидовой вариабельностью – 33,06 и 15,07%, соответственно. Межвидовая вариабельность в сравнении с внутривидовой выражена слабее (15,7%) и является статистически незначимой.

В среднем различия в $AUC_{0-\infty}$ у крыс (1 896,67 нг·мин/мл) и цыплят (1 643,33 нг·мин/мл) не превышают 13,3%. Полученные данные свидетельствуют, что после введения фентанила в одинаковых молярных количествах крысам и

Таблица 1/ Table 1

Концентрация фентанила в плазме крови крыс и цыплят после его однократного подкожного введения в дозе 100 мкг/кг ($n=3$)
Fentanyl concentration (ng/ml) in rat and chicken blood plasma after its single subcutaneous administration at a dose of 100 μ g/kg ($n=3$)

Время, мин	Концентрация, нг/мл плазмы крови			
	Крысы		Цыплята	
	Среднее значение	Стандарт. отклон.	Среднее значение	Стандарт. отклон.
5	15,08	4,18	11,26	2,42
15	39,01	12,88	28,98	4,37
30	26,34	4,61	16,24	3,54
60	5,66	2,33	14,17	1,92
120	3,19	0,70	1,87	0,32
240	1,00	0,29	-	-
300	0,53	0,36	-	-

цыплятам степень и скорость абсорбции, количество абсорбируемого активного вещества - неизмененного фентанила в организме этих животных являются близкими величинами.

Cl_r , или скорость очищения организма от фентанила, имеет близкие значения у крыс и у цыплят - 53,07 и 61,50 мл/(мин · кг), соответственно; различия не являются статистически значимыми.

Обнаружены статистически достоверные межвидовые различия таких взаимосвязанных фармакокинетических параметров, как $T_{1/2}$ и V_d ; у крыс они составляют 68,93 мин и 5,24 л/кг, у цыплят - 28,57 мин и 2,58 л/кг. Это обусловлено более интенсивным по сравнению с млекопитающими метаболизмом у птиц, что в свою очередь связано с более высокой температурой тела, темпом переваривания и абсорбции питательных веществ, интенсивностью сердечных сокращений, гормональным состоянием организма, питанием, образом жизни - с подвижностью животного и др. Следует отметить, что межвидовые различия по этим показателям в большей или меньшей степени

Таблица 2/ Table 2

Основные фармакокинетические параметры фентанила у крыс (К) и цыплят (Ц) после его однократного подкожного введения в дозе 100 мкг/кг ($n=3$)
Basic pharmacokinetic parameters of fentanyl after its single subcutaneous administration at a dose of 100 μ g/kg to rats (K) and chickens (C) ($n=3$)

Параметр	Среднее значение		Стандартное отклонение		Относительное отклонение, %	
	К	Ц	К	Ц	К	Ц
C_{max} , нг/мл	39,02	28,97	12,90	4,37	33,06	15,07
T_{max} , мин	15	15	-	-	-	-
$T_{1/2}$, мин	68,93	28,57	7,84	3,19	11,37	11,17
AUC_{0-120} , нг · мин/мл	1 843,33	1 553,33	156,95	228,11	8,51	14,69
AUC_{0-300} , нг · мин/мл	1 896,67	1 643,33	189,03	210,79	9,97	12,83
Cl_r , мл/(мин · кг)	53,07	61,50	5,08	8,23	9,57	13,38
V_d , л/кг	5,24	2,58	0,25	0,73	4,69	28,35

характерны для всех видов лабораторных животных и связаны с различной степенью связывания препарата с белками крови, его физико-химическими свойствами, спецификой метаболизма лекарства у животного, нелинейностью фармакокинетики и т. д.

Сопоставление у крыс и цыплят таких фармакокинетических параметров фентанила, как $AUC_{0-\infty}$, T_{max} , C_{max} , Cl_r , указывает на отсутствие между ними статистически достоверных различий (при $P < 0,05$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при изучении закономерностей фармакокинетики медикаментов в качестве модели могут быть использованы не только крысы, но и цыплята кур.

REFERENCES

1. Берзина Н. Птицы в эксперименте // Лаб. животные. 1995, 5(2), 99–113.
2. Холодов Л. Е., Яковлев В. П. Клиническая фармакокинетика. М.: Медцина, 1985, 69–72.
3. Anderson, L. C. Laboratory animal medicine: no typical workday // J. Am. Vet. Med. Assoc. 1986, 189(11), 1425–1427.
4. Fifth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/ UFAW Joint Working Group on Refinement. Laboratory birds: refinements in husbandry and procedures // Lab. Anim. 2001, 35(suppl. 1), 163.
5. Fryirs, B., Woodhouse, A., Huang, J. L., Dawson, M., Mather, L. E., Fryirsa, B. Determination of subnanogram concentrations of fentanyl in plasma by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with standard radio-immunoassay // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 1997, 688(1), 79–85.
6. Hendriksen, C. F. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control // Dev. Biol. Stand. 1996, 86(1), 3–10.
7. Kumar, K., Ballantyne, J. A., Baker, A. B. A sensitive assay for the simultaneous measurement of alfentanil and fentanyl in plasma // J. Pharm. Biomed. Anal. 1996, 6, 667–673.
8. Kumar, K., Morgan, D. J., Crankshaw, D. P. Determination of fentanyl and alfentanil in plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // J. Chromatogr. 1987, 419(8), 464–468.
9. Lin, S. N., Wang, T. P., Caprioli, R. M., Mo, B. P. Determination of plasma fentanyl by GC-mass spectrometry and pharmacokinetic analysis // J. Pharm. Sci. 1981, 70(11), 1276–1279.
10. Michiels, M., Hendriks, R., Heykants, J. A sensitive radioimmunoassay for fentanyl. Plasma level in dogs and man // Eur. J. Clin. Pharmacol. 1977, 12(2), 153–158.
11. Pawlik, W. W. The significance of animals in biomedical research // Folia Med. Cracov. 1998, 39(3–4), 175–182.
12. Portier, E. J., de Blok, K., Butter, J. J., van Bortel, C. J. Simultaneous determination of fentanyl and midazolam using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection // J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl. 1999, 723(1–2), 313–318.
13. Shou, W. Z., Jiang, X., Beato, B. D., Naidong, W. A highly automated 96-well solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of fentanyl in human plasma // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001, 15(7), 466–476.

Поступила в редакцию 28.11.2002

ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС И СОДЕРЖАНИЕ В- И Т-ЛИМФОЦИТОВ У КЛИНИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ МАКАКОВ РЕЗУСОВ (*MACACA MULATTA*) РАЗНОГО ВОЗРАСТА

В. З. Агрба, Б. А. Лапин, М. В. Мезенцева, Ф. И. Ершов*, Н. М. Медведева,
Н. В. Косухина, Д. Д. Карал-оглы*

НИИ медицинской приматологии Российской АМН, Сочи-Адлер

*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Российской АМН, Москва

Установлены показатели функционирования разных звеньев интерферонового (ИФН) статуса у клинически здоровых макаков резусов (*Macaca mulatta*) разных возрастных групп в сопоставлении с количественным содержанием у них В- и Т-лимфоцитов и их субпопуляций. Показано, что по сравнению с молодыми животными с возрастом ИФН-статус у обезьян меняется и характеризуется депрессией синтеза ИФН- α и ИФН- γ . Это, очевидно, связано с количественным уменьшением фракции В-лимфоцитов и функциональными нарушениями Т-клеточного звена, развивающимися при старении.

Key words: *интерфероновый статус, ИФН- α , ИФН- γ , В- и Т-лимфоциты, Macaca mulatta*

INTERFERON STATE AND B- AND T-LYMPHOCYTE COUNT IN HEALTHY *MACACA MULATTA* OF DIFFERENT AGE

V.Z. Agrba, B. A. Lapin, M. V. Mezentseva, F. I. Ershov*, N. M. Medvedeva, N. V. Kosukhina,
D. D. Karal-ogly*

Research Institute of Medical Primatology, Russian Academy of Medical Sciences, Sochi-Adler

*N. F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Indices of functioning of different sections of interferon (IFN) state have been established for healthy rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) of different age in comparison with the content of B- and T-lymphocytes and their subpopulations. IFN-state in monkeys changes with age. Development of depression of IFN- α and IFN- γ synthesis is characteristic of old monkeys in comparison with young animals. Perhaps this is a result of quantitative reduction of B-lymphocyte fraction and age induced disorders in T-lymphocytes.

Ключевые слова: *IFN-state, IFN- α , IFN- γ , B- and T-lymphocytes, Macaca mulatta*

Для моделирования патологических состояний человека в экспериментальной медицине широко используются различные виды приматов [11]. В силу их анатомо-физиологического сходства и эволюционной близости к человеку, результаты исследований, полученные на обезьянах, можно экстраполировать на людей с минималь-

ной коррекцией. Для адекватной оценки экспериментальных данных разработаны и изучены нормативные показатели функционирования различных физиологических систем этих животных, в частности, картина крови [10], активность щелочной и кислой фосфатаз [1], особенности работы эндокринной системы [2] и др.

NITROIMIDAZOLU, SULFANILAMĪDU UN TRIMETOPRIMA ATLIKUMDAUDZUMU NOTEIKŠANA PĀRTIKAS PRODUKTOS AR ŠĶIDRUMA HROMATOGRĀFIJAS – TANDĒMA MASSPEKTROMETRIJAS METODI

*Valsts Veterinārmedicīnas diagnostikas centrs
Latvijas Universitāte*

Sulfanilamīdu grupas savienojumus un trimetoprimu plaši izmanto veterinārā medicīnā, kā antibakteriālus līdzekļus ar ķīmiski – terapeitisku efektu. Preparātus pielieto zarnu infekciju un citu slimību ārstēšanai. Sulfanilamīdus bieži izmanto arī kā piedevu dzīvnieku barībai. 5-nitroimidazolu grupas preparātiem arī piemīt antibakteriāla iedarbība, tomēr, ņemot vērā to potenciālās kancerogēnās un mutagēnās īpašības, preparātu izmantošana produktīvajiem dzīvniekiem ir aizliegta.

Pielietošanas gadījumā šo veterināro preparātu atliekas var nokļūt pārtikā ar dzīvnieku izcelsmes produktiem (gaļu, pienu) un apdraudēt cilvēku veselību. Tāpēc ir nepieciešams kontrolēt šo savienojumu atlikumdaudzumu pārtikas produkcijā, izmantojot drošas un precīzas metodes.

Zinātniskajā literatūrā ir piedāvāti dažādi varianti sulfanilamīdu un trimetoprima noteikšanai dzīvnieku izcelsmes produkcijā. Sulfanilamīdu koncentrācijas novērtēšanai var izmantot imunofermentatīvo metodi vai plānslāņa hromatogrāfiju [1]. Mikrobioloģiska metode sulfanilamīdu noteikšanai nav pielietojama, jo analīzes jutība nav pietiekoša [2]. Preparātu ekstrakcijai no parauga izmanto etilacetātu [3, 4, 5], acetonitrilu [6], dihlormetānu [7]. Paraugu attīrīšanai no traucējošām vielām izmanto cietās fāzes ekstrakciju uz C18 sorbenta [7], -NH₂ sorbenta [8] vai silikagela [9]. Ir piedāvāti dažādi varianti sulfanilamīdu detektēšanai. Augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas metodes jutība ir 10-100 µg/kg [10, 11, 12], gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodes jutība ir 25-50 µg/kg [6]. Ņemot vērā nepieciešamību pirms mērīšanas ar gāzu hromatogrāfu – masspektrometru veikt sulfanilamīdu savienojumu derivatizāciju, par optimālāku metodi šo preparātu noteikšanai var uzskatīt šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas metodi (ŠH/MS/MS) [5, 6].

Nitroimidazolu grupas savienojumu noteikšanai literatūrā ir aprakstīta šķidrums hromatogrāfijas [13], gāzu hromatogrāfijas ar slāpekļa – fosfora selektīvo detektoru [14] un gāzu hromatogrāfijas – masspektrometrijas metode [15].

Neskatoties uz tēmas izklāstu vairākās publikācijās, pieejamā literatūrā nav sastopama iespēja veikt paraugu sagatavošanu, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfijas metodi. Nav arī piedāvāts variants veikt paraugu sagatavošanu, lai vienlaicīgi varētu noteikt trimetoprīma, sulfanilamīdu un nitroimidazolu saturu. Izmantojot ŠH/MS/MS metodes augsto selektivitāti, nav nepieciešams veikt dažas papildus paraugu sagatavošanas stadijas, atšķirībā no literatūrā aprakstītajām metodēm [16].

EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Mērījumu apstākļi un izmantotās iekārtas. ŠH/MS/MS mērījumiem izmantots *Micromass Quattro II* masspektrometrs ar trīskāršo kvadropolu sistēmu, *Waters Alliance 2690* šķidrums hromatogrāfs ar *Waters Symmetry C18* kolonnu (3,9×150 mm, nekustīgās fāzes slānis 5 μm). Šķidrums hromatogrāfijas parametri izokrātiskā režīmā: eluents 30% CH₃CN, 70% H₂O, analīzes laiks 10 minūtes, plūsmas ātrums 0,8 ml/min un parauga tilpums 10 μl. Masspektrometrijas parametri: atmosfēras spiediena pozitīvās ķīmiskās jonizācijas režīms, jonu reakciju monitorings. Masspektrometra parametri ir apkopoti 1.tabulā.

1.tabula

Savienojumu analīzes parametri

Nr.	Savienojuma nosaukums	Skenēšanas pārejas	Sadursmju enerģija, eV
1.	Sulfadimetoksīns	310,8 > 155,7	15
2.	Trimetoprīms	290,9 > 229,8	25
3.	Sulfahlorpiridazols	284,7 > 155,7	15
4.	Sulfadimidīns	278,8 > 185,7	15
5.	Sulfametizols	270,8 > 155,7	15
6.	Sulfatiazols	255,7 > 155,7	15
7.	Sulfanilamīds	213,7 > 172,7	8
8.	Metronidazols	172,0 > 128,0	10
9.	Ronidazols	201,0 > 140,0	12

Gelfiltrācijas hromatogrāfijas eksperimentiem izmantots *Waters* firmas sūknis 515, automātiskais paraugu ievadītājs *Waters 717-plus*, frakciju kolektors *Waters II* un stikla kolonna (11×500 mm), kas pildīta ar *Bio-Beads S-X3* gelu. Kustīgā fāze: etilacetāts/cikloheksāns (tilpuma attiecība 1:1), plūsmas ātrums 1 ml/min.

Darbam par standartvielām izmantoti sulfadimidīns, sulfahloropiridazīns, dapsons, sulfatiazols, trimetoprims, ronidazols, metronidazols (*Riedel-de-Haen*), sulfanilamīds, sulfadiazīns, sulfadimetoksīns, sulfametizols (*Sigma*). Par iekšējo standartu izmantots sulfadimidīns-d4 (*RIVM*).

Paraugu sagatavošana, izmantojot šķidrums – šķidrums ekstrāciju. Gaļas paraugam atdala taukus, 5 g nosver 50 ml centrifūgas mēģenē, pievieno 10 ml acetonitrila, 100 µl iekšējā standarta ar koncentrāciju 5 ng/µl un homogenizē ar *Ultra – Turrax*. Krata 10 min un 10 min centrifugē 3000 apgr/min 15°C temperatūrā. Ekstraktu filtrē caur papīra filtru, kurā iebērts nātrija sulfāts. Acetonitrila ekstraktam pievieno 15 ml heksāna, krata mēģeni 10 min un 10 min centrifugē 3000 apgr./min. Atdala heksāna slāni un ietvaicē acetonitrilu līdz sausam slāpekļa plūsmā 40°C temperatūrā. Sausam atlikumam pievieno 100 µl acetonitrila – dejonizēta ūdens maisījuma (30:70). Nosaka veterināro zāļu atlieku koncentrāciju, izmantojot ŠH/MS/MS.

Paraugu sagatavošana, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju. Gaļas paraugam atdala taukus, 5 g iesver 50 ml centrifūgas mēģenē, pievieno 15 ml cikloheksāna – etilacetāta maisījuma (1:1), 100µl iekšējā standarta ar koncentrāciju 5 ng/µl un homogenizē ar *Ultra Turrax*. Krata 10 min un 10 min centrifugē 3000 apgr./min 15°C temperatūrā. Ekstraktu filtrē caur papīra filtru, kurā iebērts nātrija sulfāts, paraugam pievieno vēl 15 ml cikloheksāna – etilacetāta maisījuma (1:1) un atkārtoti ekstrāciju. 30 ml ekstrakta iztvaicē ar rotācijas ietvaicētāju (40°C, 235 mbar). Sausam atlikumam pievieno 4 ml cikloheksāna – etilacetāta maisījuma (1:1), filtrē caur *Millex* filtru (poru izmērs 0,45 µm) un savāc 4 ml stikla pudelēs. Attīra paraugu, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju. Ieslēdz eluenta plūsmu ar ātrumu 0,5 ml/min un 30 min laikā līdzsvaro kolonnas gelu ar mobilo fāzi. Palielina mobilās fāzes plūsmas ātrumu līdz 1 ml/min un ievieto paraugus autosamplerā. Atbilstoši autosamplera programmai, 1 ml parauga šķīduma tiek ievadīts kolonnā. Frakciju kolektors savāc frakciju no 24. līdz 49. minūtei, kas atbilst mobilās fāzes tilpumam 25 ml. Kolonnu skalo ar eluentu vienu minūti un tad ievada citu paraugu. Iztvaicē parauga frakciju, sausajam atlikumam pievieno 100 µl acetonitrila – dejonizēta ūdens maisījuma (30:70). Nosaka veterināro zāļu atlieku koncentrāciju, izmantojot ŠH/MS/MS.

REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒŠANA

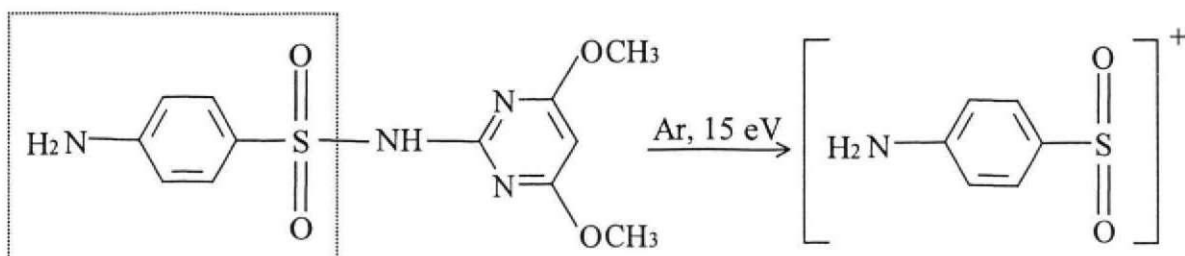
Sulfanilamīdu un nitroimidazolu fragmentācija, šķidrums hromatogrāfijas – masspektrometrijas analīžu apstākļu izvēle

Izstrādājot metodi sulfanilamīdu, trimetoprima un nitroimidazolu noteikšanai ar ŠH/MS/MS metodi, vispirms tika izvēlēti optimālākie mērīšanas parametri. Šajā nolūkā veiktas šādas procedūras:

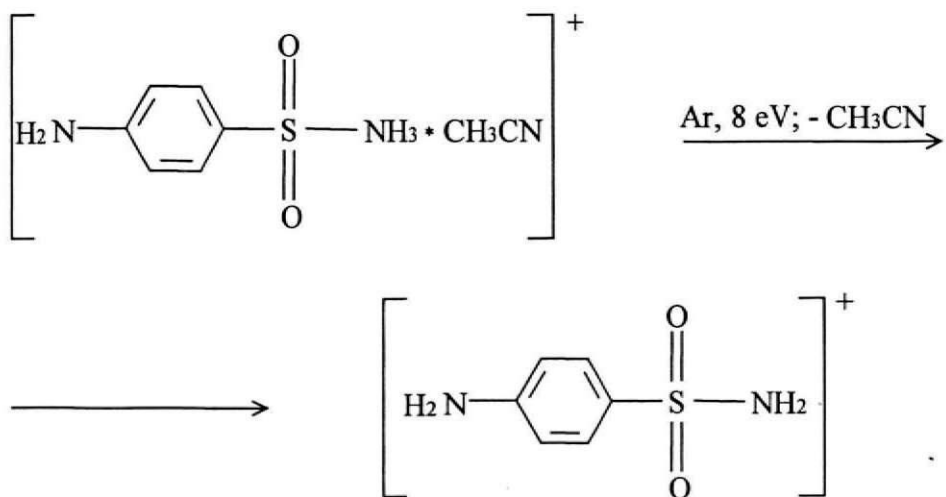
- uzņemti sulfanilamīdu, trimetoprima un nitroimidazolu standartvielu masspektri,
- analīzei izvēlēts molekulārais jons un veikta tā fragmentācija,
- no šķembu joniem izvēlēts fragments (jons) ar lielāko intensitāti (izņemot sulfanilamīdu).

Iespējamās fragmentācijas shēmas ir šādas:

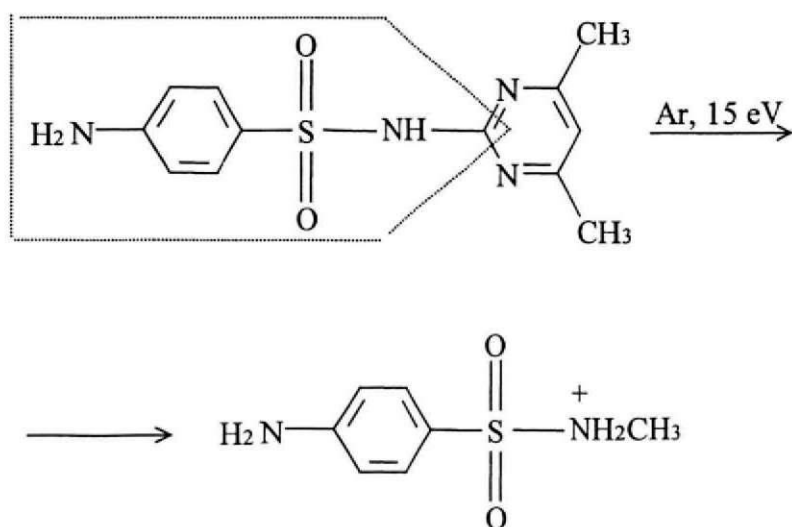
sulfadimetoksīnam, sulfahlorpiridazolam, sulfametizolam un sulfatiazolam ir līdzīga fragmentācija:



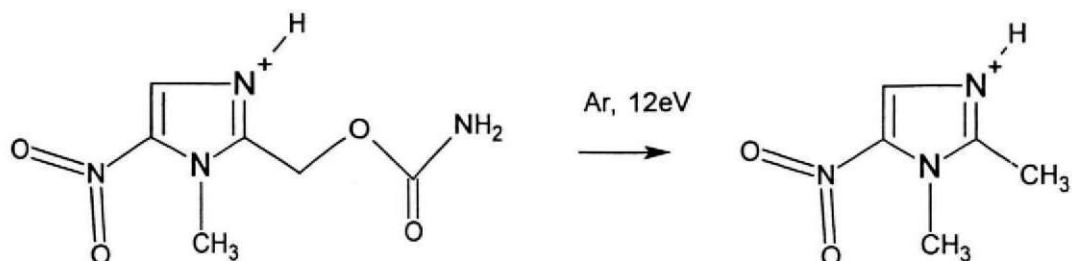
Sulfanilamīds veido aduktu:



Sulfadimidīns fragmentējas sekojoši:



Nitroimidazola grupas savienojuma (ronidazols) fragmentācija realizējas sekojoši:



Noteikšanas metodes parametru pārbaude.

Sulfanilamīdu un trimetoprīma detektēšanas linearitāte

Lai veiktu veterināro zāļu atlieku kvantitatīvu noteikšanu, ir nepieciešams pārbaudīt attiecīgu graduēšanas grafiku linearitāti. Tika pagatavoti sulfanilamīdu, trimetoprīma un nitroimidazolu standartšķīdumi ar koncentrācijām 10, 5, 1, 0,5 un 0,1 ng/μl un uzņemtas hromatogrammas. Pēc graduēšanas grafiku konstruēšanas aprēķina taisnes vienādojumus un korelācijas koeficientus.

2.tabula

Savienojumu detektēšanas linearitāte

Nosaukums	Standartšķīdumu koncentrācija, ng/μl					Taisnes vienādojums	Not. koef. R ²
	10	5	1	0,5	0,1		
	Smailes laukums						
Sulfadimetoksīns	5935	2279	365	210	42	y= 588,92x-189,01	0,987
Trimetoprīms	4901	2354	545	371	197	y= 474,34x+ 98,79	0,999
Sulfahlorpiridazols	16971	8006	1165	673	118	y= 1712,4x-298,66	0,999
Sulfadimidīns	10875	4702	719	363	77	y= 1090,7x-274,09	0,996
Sulfametizols	16986	6912	1017	377	76	y= 1706,5x-591,85	0,992
Sulfatiazols	27233	11116	1818	687	153	y= 2725,9x-848,65	0,993
Sulfanilamīds	30812	13961	2642	1441	291	y = 3066,1x-350,13	0,998
Ronidazols	1882	995	137	98	17	y = 190,8x-6,44	0,998
Metronidazols	11558	4854	774	369	56	y = 1146,4x-236,5	0,994

No iegūtiem datiem var secināt, ka gandrīz visiem nitroimidazoliem un sulfanilamīdiem ir laba linearitāte, jo korelācijas koeficienti svārstās no 0,987 līdz 0,999. Nedaudz sliktāka linearitāte ir sulfadimetoksīnam ($R^2 = 0,987$), sulfametizolam ($R^2 = 0,992$).

Veicot savienojumu graduēšanu ar matricu (izmantojot standartpiedevas 20, 50, 80 un 100 ng/g) tika iegūtas šādi graduēšanas grafiku noteikšanas koeficienti:

sulfadimetoksīns $R^2 = 0,996$

trimetoprīms $R^2 = 0,995$

sulfahlorpiridazīns	$R^2 = 0,997$
sulfadimidīns	$R^2 = 0,994$
sulfametizols	$R^2 = 0,999$
sulfatiazols	$R^2 = 0,996$
ronidazols	$R^2 = 0,999$
metronidazols	$R^2 = 0,994$

Līdz ar to sulfanilamīdu un nitroimidazolu šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas noteikšanas metodei ir novērojama laba korelācija starp šķīdumu koncentrāciju un masspektrometra analītisko signālu.

Noteikšanas robeža

Saskaņā ar Latvijas likumdošanu, sulfanilamīdu atlieku daudzums dzīvnieku audos nedrīkst pārsniegt 100 ng/g. Nitroimidazolu klātbūtne pārtikas produktos nav pieļaujama. Noteikšanas robežas tika aprēķinātas standartšķīdumam ($c=0,5$ ng/ μ l) un paraugam ar piedevu 100 ng/g.

3. tabula

Savienojumu noteikšanas robeža

Nosaukums	Standartšķīdumā			Paugā	
	Koncentrācija, ng/ μ l	Signāls/ troksnis, S/N	Noteikšanas robeža, ng/ μ l	Signāls/ troksnis, S/N (100 ng/g)	Noteikšanas robeža, ng/g
Sulfadimetoksīns	0,5	10,09	0,15	18,9	16
Trimetoprimis	0,5	30,75	0,05	37,9	8
Sulfahlor- piridazols	0,5	26,69	0,06	91,6	3
Sulfadimidīns	0,5	57,45	0,03	100,1	3
Sulfametizols	0,5	24,98	0,06	76,8	4
Sulfatiazols	0,5	15,82	0,09	128,0	2
Sulfanilamīds	0,5	16,41	0,09	29,5	10
Ronidazols	0,5	14,40	0,10	52,69 (50ng/g)	3

Metronidazols	0,5	61,68	0,02	41,10 (50ng/g)	4
Vidējā noteikšanas robeža, ng/g					7

No rezultātiem var secināt, ka izstrādātā paraugu sagatavošanas metode ir jutīga pret visiem darbā izmantotajiem sulfanilamīdiem, trimetoprimu un nitroimidazoliem.

Gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācija

Veicot analītiskās metodes izstrādi, tika pārbaudīta iespēja izmantot gelfiltrācijas hromatogrāfijas metodi bioloģiskā parauga ekstrakta attīrīšanai no traucējošām vielām, nosakot sulfanilamīdu un trimetoprima saturu. Gelfiltrācijas hromatogrāfija ļauj atdalīt savienojumus ar augstu molekulmasu (taukus un olbaltumvielas) no mazmolekulāriem savienojumiem. Gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācija (frakciju tilpuma izvēle) tika veikta, izmantojot polihlorbifenilu (PHB) maisījumu ar molekulmasām diapazonā 200-400 Da. Sulfanilamīdu un nitroimidazolu molekulmasas arī atrodas šajā diapazonā, tāpēc datus ir iespējams izmantot, lai novērtētu metodes kvalitāti. Eksperimentā tika savāktas frakcijas ar intervālu 3 ml un noteiktas PHB koncentrācijas frakcijā ar gāzu hromatogrāfijas metodi. Rezultāti ir apkopoti 4. tabulā.

4.tabula

Gelfiltrācijas hromatogrāfijas frakcijas izvēle

Frakcija, ml	Gāzu hromatogrāfijas smaīņu laukumi, nosakot PHB saturu frakcijā				
	PHB28	PHB52	PHB138	PHB153	PHB180
22-25	7,2	0	0	0	7,4
25-28	6,9	11,3	44,6	25,5	28,2
28-31	133,8	141,4	252,8	276,5	308,9
31-34	241,7	160,1	281,6	346	397,1
34-37	132,1	88,9	154,4	194,2	221,6
37-40	79,8	55,1	97,7	117,5	136,4
40-43	55,9	40,3	66,7	81,1	97,3
43-46	42,1	28,2	47,7	58,6	67,9
46-49	27,8	18,5	35,3	42,5	50,9
49-50,5	23,4	17,5	29,7	39,2	41,5

PHB saturs frakcijās 25-49ml (%)	95,9	96,9	97,1	96,7	96,4
Frakcija, kas satur maksimālo PHB koncentrāciju	31-34 ml	31-34 ml	31-34 ml	31-34 ml	31-34 ml

No rezultātiem var secināt, ka izvēloties frakciju tilpumu 24-49 ml, polihlorbifenīlu atgūstamība (R) ir >95% un tādējādi šos gelfiltrācijas parametrus var izmantot arī citu vielu ar līdzīgu molmasu atdalīšanai no lielmolekulārām vielām.

Sulfanilamīdu attīrīšanas efektivitāte, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju.

Pēc gelfiltrācijas hromatogrāfijas apstākļu optimizācijas, izvēlētie parametri tika izmantoti sulfanilamīdu un trimetoprima hromatogrāfijas efektivitātes pārbaudei. 1 ml sulfanilamīdu standartšķīduma ar koncentrāciju 25 µg/ml tika attīrīts gelfiltrācijas hromatogrāfā, savācot 25 ml frakciju. Salīdzināšanai 1 ml standartšķīduma tika atšķaidīts līdz 25 ml ar etilacetāta un cikloheksāna maisījumu (1:1). Pēc linearitātes pārbaudes, sulfanilamīdu atgūstamība (R) tika novērtēta, salīdzinot eluāta un standartšķīduma absorbcijas (A_{pirms} , $A_{pēc}$). Rezultāti ir apkopoti 5. tabulā.

5. tabula

Sulfanilamīdu atgūstamība, veicot parauga attīrīšanu ar gelfiltrāciju

Nr	Savienojuma nosaukuma	λ , nm	A_{pirms}	$A_{pēc}$	R, %
1.	sulfanilamīds	261	0,089	0,096	108
2.	sulfadiazīns	267	0,125	0,108	86
3.	sulfadimidīns	267	0,090	0,044	49
4.	sulfahloropiridazīns	272	0,085	0,063	74
5.	sulfadimetoksīns	269	0,082	0,083	101
6.	dapsons	258	0,047	0,025	53
7.	sulfatiazols	259	0,039	0,030	77
8.	sulfametizols	258	0,039	0,034	87
Vidējā sulfanilamīdu atgūstamība, %					79

Rezultāti rāda, ka vidējā sulfanilamīdu atgūstamība, izmantojot paraugu attīrīšanu ar gelfiltrācijas metodi ir 79%. Tas liecina par iespēju izmantot gelfiltrācijas hromatogrāfiju bioloģisko paraugu attīrīšanai. Iespējams, ka sulfanilamīdu zudumi ir saistīti ar mijiedarbību starp gela virsmu un molekulām, un adsorbciju uz stikla virsmas. Rezultātā notiek smaiļu paplašināšanās un atgūstamības samazināšanās.

Secinājumi. Tika izstrādāta šķidrums hromatogrāfijas – tandēma masspektrometrijas metode, ar ko vienlaicīgi var noteikt sulfanilamīdu, nitroimidazolu un trimetoprima atliekas dzīvnieku izcelmes produkcijā. Aprakstītas vienkāršas paraugu sagatavošanas metodes, izmantojot gelfiltrācijas hromatogrāfiju un šķidrums – šķidrums ekstrakciju. Izstrādāta metode ir selektīva, lineāra un jutīga.

LITERATŪRA

1. *Abjean Jp.* JAOAC Int., 1997, **80**, 4, 737.
2. *Heitzman R.J.* Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: Reference materials and methods. Blackwell scientific publications, Oxford, 1994.
3. *McCracken R.J., Spence D.E., Kennedy D.G.* Food Addit Contam., 2000, **17**, 11, 907.
4. *Smedley M. D., Weber J. D.* JAOAC Int., 1990, **73**, 6, 875.
5. *Kristiansen G. K., Brock R., Bojesen G.* Anal. Chem., 1994, **66**, 3253.
6. *Tarbin JA., Charke P., Shearer G. J.* Chromatogr.B., 1995, **729**, 1, 127.
7. *Shearan P., O'Keeffe M., Smyth M.R.* Food Add. Contam., 1994, **11**, 1, 7.
8. *Ikai Y., Oka H., Kawamura N., Hayakawa J., Yamada M., Harada K., Suzuki M., Nakazawa H.* J.Chromatogr.B., 1991, **541**, 393.
9. *Mooser A.E., Koch H.* AOAC Int., 1993, **76**, 5, 976.
10. *Tsai CE., Kondo F., Ueyama J., Azama J. J.* Chromatogr., 1995, **33**, 7, 365.
11. *Gehring T.A., Rushing L.G., Thompson H.C.,* JAOAC Int., 1997, **80**, 4, 751.
12. *Smedley M.D., Weber J.D. J.* AOAC Int., 1990, **73**, 6, 875.
13. *Shen J., Yhang Y, Zhang S, Ding S, Xiang X,* JAOAC Int., 2003, **86**, 3, 505.
14. *Wang J.H.* J Chromatogr.A., 2001, **918**, 2, 435.
15. *Polzer J., P.Gowik.* J.Chromatogr.B., 2001, **761**, 47.
16. *Kao Y.M., Chang M.H., Cheng C.C., Chou S.S.* Journal of Food and Drug Analysis, 2001, **9**, 2, 84.

V.Bartkevičs, E.Birkule, J.Ģibietis

**ANALYSIS OF SULPHONAMIDES, TRIMETOPRIM AND
NITROIMIDAZOLE RESIDUAL AMOUNT USING LIQUID
CHROMATORAPHY - TANDEM MASSPECTROMETRY**

This publication is dealing with determination of sulphonamides, trimetoprim and nitroimidazole residues in animal origin products. Simple and sensitive method for simultaneous determination of these compounds using liquid chromatography - tandem massspectrometry is proposed. Possible fragmentation patterns of compounds in electrospray ionization mode are considered. Main characteristics of the proposed LC/MS/MS method are evaluated. Possibility to apply gel permeation chromatography for the sample clean-up in residue analysis of sulphonamides is described.

**RĪGAS TEHNISKĀS UNIVERSITĀTES
ZINĀTNISKIE RAKSTI**

**SCIENTIFIC PROCEEDINGS
OF RIGA TECHNICAL UNIVERSITY**

SĒRIJA 1

MATERIĀLZINĀTNE UN LIETIŠKĀ ĶĪMIJA

MATERIAL SCIENCE AND APPLIED CHEMISTRY

SĒJUMS 6

ACYLATION OF STEROID COMPOUNDS BY FLUORINATED ANHYDRIDES: REACTION PATTERNS, MASSPECTROMETRIC FRAGMENTATION OF PRODUCTS AND APPLICABILITY OF DERIVATIVES FOR ANALYSIS IN CHEMICAL IONISATION MODE.

V.Bartkevics, J.Gibietis

Key words: steroid compounds, HFBA, GC-MS, veterinary drug residues

Introduction

Use of anabolic steroids for agricultural meat production was officially banned in Europe in the 80's. Taking into account growing public concern with issues of food safety use of reliable multi-residue method for analysis of steroid compound in official control of food products is very important. Most of methods used for analysis of steroid compounds employ several silylating reagents and several sample preparation routes for analysis of androgens, gestagens, stilbenes and resorcylic acid lactones [1, 2, 3]. Such approach being selective and sensitive however has several drawbacks because different sample preparation and derivatisation procedures are time-consuming and expensive and it is necessary to use several internal standards as well. Besides silylating reagents deteriorate the massspectrometric system rapidly in case of extensive use.

This paper is devoted to development of analytical method for determination of residues of steroid compounds in animal origin products using single sample preparation method, derivatisation by fluorinated anhydrides and detection of products by gas chromatography – massspectrometry in electron impact and positive and negative ions chemical ionisation.

Materials and methods

Apparatus. Analyses were performed on a HP 5973 quadruple mass spectrometer coupled to a HP 6890 gas chromatograph (Hewlett Packard) equipped with DB-5 fused silica column (30 m × 0.25 mm id., 0.25 μm).

Chemicals. Reagents and solvents were of analytical grade quality and provided by Baker (Griesheim, Germany) and Acros (Geel, Belgium). The solid phase extraction columns (C18, 100 mg / 1 ml) were from Waters. The derivation reagents pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA) and heptafluorobutyric acid anhydride (HFBA) were purchased from Alltech (Lokeren, Belgium). The reference steroids were from Riedel-de Haen (Seelze, Germany) Vetranal® series.

Sample pre-treatment, extraction and purification.

Urine: 1 ml of acetate buffer solution (pH 5.2) and 25 μl of glucuronidase were added to 5 ml of urine. Solution was incubated at 37°C during 2 h. Steroid compound were extracted twice with 5 ml of tert-butylmethylether (TBME).

Meat: 5 g of meat were extracted twice with 5 ml of tert-butylmethylether (TBME) with Ultra-Turrax homogenisator.

Combined TBME extracts were evaporated to dryness under N_2 flow in water bath at $40^\circ C$. 3 ml methanol, 1 ml water and 25 μl of internal standard (dichlorophene) were added to dry residue. Fat was eliminated by extraction with 4 ml of hexane. Steroid compounds were extracted from methanol/water layer by addition of 5 ml dichloromethane. Dichloromethane layer was evaporated to dryness. Residue was dissolved in 1 ml 40% solution of methanol in water and transferred to the top of the C18 column previously conditioned with 1 ml of methanol and 1 ml of water. The column was washed with 1 ml of 40% methanol and 20% acetone. Steroid compounds were eluted with 2 ml of methanol. Methanol was evaporated to dryness in N_2 steam in water bath at $40^\circ C$.

Derivatisation. 75 μl of acetone and 25 μl of HFBA or PFPA were applied to dry residue. Derivatisation was performed 60 min at $60^\circ C$. After derivatisation mixture was evaporated under N_2 flow in water bath at $40^\circ C$. Residue was dissolved in 100 μl of isooctane and 1 μl was used for GC-MS analysis.

Results and discussion

Derivatisation and pattern of mass-spectrometric fragmentation. Steroid compounds were derivated with HFBA and products of derivatisation were analysed by GC-MS in negative ion (NICI), positive ion (PICI) chemical ionisation and electron impact (EI) mode. According to the results of analysis all compounds could be subdivided into 2 groups – reacting with 1 or 2 molecules of HFBA. As examples of such compounds estradiol (I) and estrone (II) could be represented.

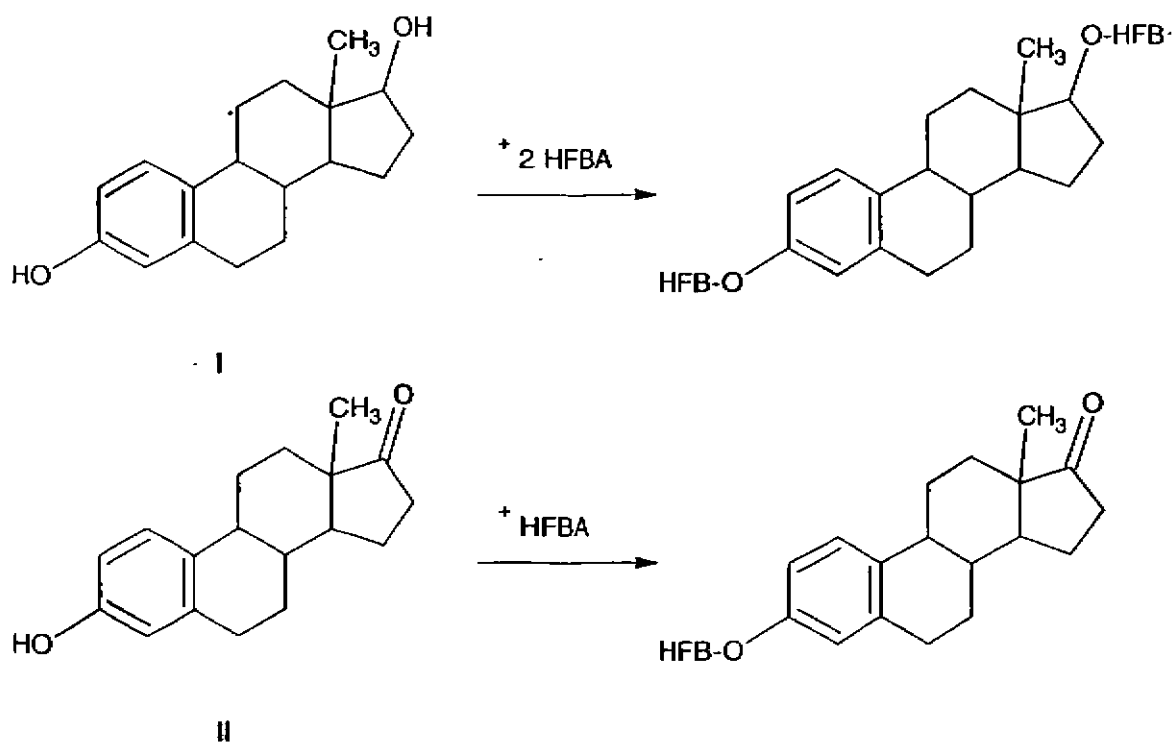


Table 1 explains importance of distinguishing between those 2 groups.

Table 1

Different sensitivities of steroids derivatisation products in PICI and NICI mode

Name of compound	Height of peak obtained from 100 ng/ μ l solution		Ratio of peak height PICI / NICI	Number of HFB in derivate
	In PICI mode	In NICI mode		
Estrone	133353	8045	17	1
Androstendione	70768	6483	11	1
Androsterone	199858	14961	14	1
17-methyltestosterone	89716	1301	69	1
Average ratio for compounds containing 1 HFB group			28	
Diethylstilbestrol	65457	285605	0.23	2
Boldenone	309362	230469	1.3	2
Estriol	217914	263342	0.83	2
Hexestriol	153497	44462	3.5	2
21-Hydroxyprogesterone	15250	82419	0.19	2
Average ratio for compounds containing 2 HFB groups			1.2	

It can be inferred from the results that negative ion chemical ionisation is not so sensitive for compounds containing only one HFB group. In this case use of positive ion chemical ionisation or electron impact ionisation is advisable. For compounds containing two HFB groups use of NICI is recommendable because of highest selectivity of analysis in negative ion chemical ionisation mode.

Based on fragmentation data of mass spectra GC-MS conditions were chosen for analysis of steroid compound in selected ion monitoring (SIM) mode. These data are summarised in table 2.

During elaboration of method of analysis derivatisation with HFBA and PFPA was checked. Results show that derivatisation with PFPA gives products with lower GC-MS response. Besides HFBA derivatisation yields products with increased retention times and diagnostic ion masses (50 u for one HFB group): the consequence is the better specificity of chromatograms. Figure 1 shows products of competitive derivatisation of nandrolone with mixture of HFBA and PFPA (1:1). Peak with retention time 23.11 min is nandrolone containing 2 molecules of HFB, peak with RT 22.57 min – nandrolone containing 1 HFB and 1 PFP group and peak with RT 22.05 min – nandrolone with 2 PFP groups. So further elaboration of method was done using HFBA derivatisation.

Table 2

Choice of ions for SIM analysis of steroid compounds after derivatisation with HFBA:

Compound	Ions in EI mode	Ions in PICI mode	Ions in NICI mode
Dienoestrol	445; 658	-	442; 461
Hexestrol	331; 303	-	446; 465
Diethylstilbestrol	660; 631	-	444; 463
17 α -Methyltestosterone	465; 480	461; 479; 481; 521	-
Zeranol	696; 625	-	499; 674; 694; 713
Boldenone	678; 464	-	462; 462; 658; 678
Nandrolone	666; 453	-	430; 450; 469; 646
Androsterone	486; 442	469; 487; 255; 273	
Testosterone	680; 467	-	444; 464; 483; 660
17 β -Estradiol	664; 409	-	427; 624; 644; 645
Estriol	663; 449	-	446; 639; 679; 710
Androstendione	482; 449	445; 465; 483; 511	-
Estrone	466; 422	449; 467; 495; 507	-
Progesterone	510; 467	467; 493; 511; 539	-
21-Hydroxyprogesterone	722; 707	-	525; 702; 703; 704
Megestrol acetate	477; 580	-	738; 758
Medroxyprogesteron acetate	479; 582	-	740; 760

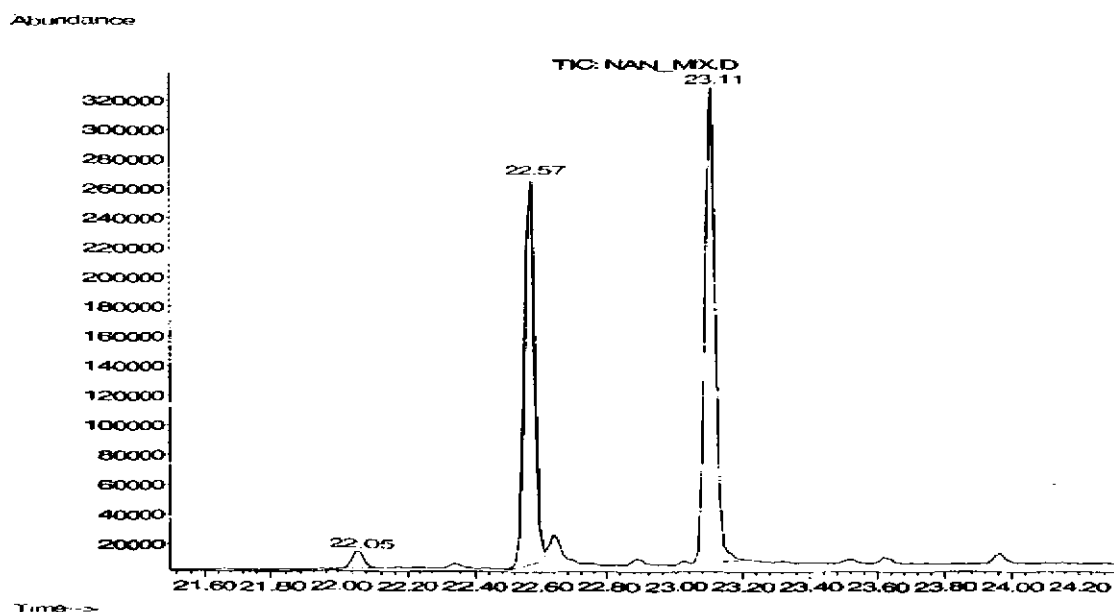


Figure 1: GC-MS NICI response of nandrolone competitive derivatisation (HFBA+PFPA) products.

Method parameters. Linearity.

In order to check a performance of analytical method main parameters of analysis (linearity, repeatability, recovery and limit of detection) was evaluated for 11 steroid compounds. Linearity of detection system was checked using standard solutions with 5 different concentrations. After derivatisation with HFBA and GC-MS measurements calibration curve was constructed. Results show that method exhibits good correlation (R^2 ranging from 0.993 for diethylstilbestrol to 1.000 for megestrol acetate) between GC-MS response and concentration of steroids. Calibration curve in NICI GC-MS mode is better fitted by quadratic regression.

Repeatability. Five samples with equal spike level was independently analysed and relative standard deviation was calculated.

Table 3

Repeatability of analytical method for detection of steroid compounds (n=5)

Compound	RSD, %	Compound	RSD, %
Dienoestrol	10	Testosterone	11
Hexestrol	9.4	17 β -Estradiol	12
Diethylstilbestrol	12	Progesterone	11
17 α -Methyltestosterone	15	Megestrol acetate	20
Boldenone	10	Medroxyprogesterone acetate	13
Nandrolon	12		

It follows from the results that method indicates repeatability ranging from 9 to 20%. For routine analyses repeatability of internal standard could be used as quality parameter. Application of elaborated method for routing analyses showed repeatability of internal standard to be in range 8-15% (n=8÷16).

Recovery. Recoveries of steroid compound are given in Table 4.

Table 4

Absolute recoveries of steroid compounds

Compound	Recovery, %	Compound	Recovery, %
Dienoestrol	54	Testosterone	88
Hexestrol	69	17 β -Estradiol	137
Diethylstilbestrol	54	Progesterone	84
Boldenone	143	Megestrol acetate	106
Nandrolone	67	Medroxyprogesterone acetate	117

Broad interval of recoveries could be explained by two main factors – losses of analytes during sample preparation procedures and enhancing effect of matrix.

Sensitivity. Sensitivity is the most important parameter of this analytical method since most of compound needs positive detection. Sensitivity of method was calculated based on signal-to-noise ratio 3/1 of spiked chromatograms. Results are given in Table 5.

Recommendations for laboratories performing analysis of residues of steroid compounds indicate target sensitivity below 1 ng/g. Results show that elaborated method is sensitive and applicable for control of steroids residues in food products.

Table 5

Limit of detection (LOD) of steroid compounds

Compound	LOD, ng/g	Compound	LOD, ng/g
Dienoestrol	0.3	Testosterone	0.16
Hexestrol	0.04	17 β -Estradiol	0.13
Diethylstilbestrol	0.13	Progesterone	0.3
17 α -Methyltestosterone	0.2	Megestrol acetate	0.7
Boldenone	0.14	Medroxyprogesterone acetate	1.8
Nandrolone	0.2		

Recommendations for laboratories performing analysis of residues of steroid compounds indicate target sensitivity below 1 ng/g. Results show that elaborated method is sensitive and applicable for control of steroids residues in food products.

Conclusion

Results of conducted experiments showed that all 17 steroid compounds react with HFBA giving products with different number of HFB groups. Depending on number of fluorine atoms in derivatisation products a type of GC-MS ionisation (NICI, PICI or EI) mode should be chosen. NICI is preferable for molecules containing 2 HFB groups. Single sample preparation procedure could be applied for analysis of these compounds in food products. Method is sensitive (LOD from 0.04 ng/g for hexestrol to 1.8 ng/g for medroxyprogesterone), accurate and precise. Practicability of elaborated method was evaluated by implementation in veterinary drug residue monitoring program in Latvia.

Literature

1. S.Prevoost, B.L.Bizec, P.Marchand, F.Monteau, F.Andre. Detection of anabolic steroid residues in hair by gas chromatography coupled to mass spectrometry. In *Proceedings of the EuroResidue IV Conference 'Residues of Veterinary Drugs in Food'*; Veldhoven, The Netherlands, 2000, 856-862.
2. X.S.Deng, A.Kurosu, D.J.Pounder. Detection of anabolic steroids in head hair. *J.Forensic Sci.*, 1999, 44(2), 343-346.

3. S.Hartmann, H.Steinhardt. Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J.Chromatogr. B.Biomed. Sci. Appl.*, 1997, 704 (1-2), 105-117.

Vadims Bartkevics, head of instrumental analysis division, M.Sc.
State Veterinary Medicine Diagnostic Centre Food Control Laboratory
Address: Lejupes str. 3, LV 1076, Riga, Latvia
Phone: 7620624; Fax: 7620434

Janis Gibietis, associated professor, Dr.chem.
University of Latvia, Faculty of Chemistry
Address: Kr.Valdemara str. 48, Riga, Latvia
Phone: +371 7372566; Fax: +371 7379302

V.Bartkevics, J.Gibietis. Acylation of steroid compounds by fluorinated anhydrides: reaction patterns, mass-spectrometric fragmentation of products and applicability of derivatives for analysis in chemical ionisation mode.

Applicability of acylation by HFBA for derivatisation of 17 steroid compounds and mass-spectrometric fragmentation of derivatisation products is investigated. GC-MS conditions (SIM ions, type of chemical ionisation mode) are described. Sensitive multi-residue method for determination of residues of steroid compounds based on single sample preparation procedure with C18 SPE cartridges and derivatisation with HFBA is proposed.