CH 6.24. Stanovenie nitroimidazolov a ich metabolitov metódou LC- MS/MS

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie nitroimidazolov v mäse, mlieku, krvi, vajciach, mede a v krmivách. Metóda bola prevzatá z referenčného pracoviska Európskej Únie pre zakázané liečivá – Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin v Berlíne.

Táto metóda je vhodná pre konfirmáciu a kvantifikáciu nasledovných nitroimidazolov v koncetračnom rozsahu (0,5 - 100) µg/kg:

1,2-dimetyl-5-nitroimidazol (dimetridazol, DMZ)

1-metyl-2-[(carbamoyloxy)metyl]-5-nitroimidazol (ronidazol, RNZ)

2-hydroxymetyl-1-methyl-5-nitroimidazol (HMMNI ≡ RNZOH ≡ DMZOH)

1-(2-hydroxyetyl)-2-methyl-5-nitroimidazol (metronidazol, MNZ)

1-(2-hydroxyetyl)-2-hydroxymethyl-5-nitroimidazol (MNZOH)

1-metyl-2-isopropyl-5-nitroimidazol (ipronidazol, IPZ)

1-metyl-2-hydroxyisopropyl-5-nitroimidazol (ipronidazol, IPZOH)

1-(3-hydroxypropyl)-2-metyl-5-nitroimidazol (ternidazol, TNZ)

2. Princíp metódy

Rezíduá nitroimidazolov sa stanovujú metódou, ktorá pozostáva z nasledovných krokov:

- homogenizácia
- enzymatická hydrolýza
- extrakcia tuhou fázou
- LC-MS/MS meranie

3. Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

- analytické váhy, vortex, rotačná vákuová odparka, centrifúga, termostat, kvapalinový chromatograf s hmotnostno-spektrometrickým detektorom (LC-MS/MS)

3.2 Chemikálie a roztoky

Rozpúšťadlá

- hexán, tert-butylmetyléter, etylacetát, n-heptán, etanol, p.a., acetonitril, gradient grade
-

Chemikálie

- HCl, NaCl p.a., KH_2PO_4, NaOH, mravčan amónny, kyselina mravčia pre HPLC
- proteáza, typ *Rhizopus sp.*

Roztoky

- 25 % HCl
- 0,002 mol/l HCl
- 5 mol/l NaOH

- Fosfátový tlmivý pufor: $NaCl/KH_2PO_4$
- etylacetát : tert-butylmetyléter (1:1 v/v)

4. Pracovný postup

4.1 Príprava štandardov

Ako rozpúšťadlo je použitý etanol. Štandardná kalibračná krivka sa pripravuje v rozsahu 1 až 5 ng/g podľa potreby.

4.2 Príprava vzorky

4.2.1 Homogenizácia, hydrolýza a odtučnenie

Vajcia

K 2 g zhomogenizovanej vzorky pridať 10 ml pufru, 1 ml roztoku proteázy, 100 μl zmesi interných štandardov a upraviť pH na hodnotu 3,0 použitím 25 % HCl a dobre premiešať. Vzorku hydrolyzovať cez noc v termostate pri 37°C.

Na druhý deň najprv opäť skontrolovať pH 3,0 a v prípade potreby upraviť na túto hodnotu. Následne pridať 10 ml hexánu, poriadne premiešať na vortexe (20 – 30s) a centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a teplote 4°C. Hornú vrstvu dekantovať a k peletám pridať 4,5 ml pufru (pH 3,0) a 5 ml hexánu, všetko premiešať a centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Hexánovú vrstvu opäť dekantovať. Opäť pridať 10 ml hexánu, jemne premiešať a centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Hornú hexánovú vrstvu odstrániť aj s tuhými časticami, upraviť pH na 6,0 pomocou 5 mol/l NaOH a čistú vodnú fázu doplniť do 18 ml vodou.

Mäso

K 5 g mäsa pridať 8 ml pufru (pH 3,0), 1 ml proteázy, 25 μl zmesi interných štandardov a dôkladne homogenizovať na vortexe. Následne upraviť pH na 3,0 pomocou 25% HCl a znova poriadne premiešať. Vzorku nechať hydrolyzovať cez noc v termostate pri 37°C.

Na druhý deň centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Supernatant zliať do čistej skúmavky a k sedimentu pridať 8 ml pufru (pH 3,0) a premiešať, opäť centrifugovať. Oba supernatanty spojiť a upraviť pH na 3,0. Následne pridať 10 ml hexánu, dôkladne homogenizovať na vortexe (20 – 30s), centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Hexánovú vrstvu odstrániť, vo vodnej vrstve upraviť pH na 6,0 pomocou 5 mol/l NaOH a doplniť vodou do 18 ml.

Med

K 5 g medu pridať 10 ml pufru (pH 3,0) a rozpustiť premiešaním na vortexe. Potom pridať 1 ml proteázy, 25 μl zmesi interných štandardov a dôkladne homogenizovať na vortexe. Následne upraviť pH na 3,0 pomocou 25% HCl, znova poriadne premiešať na vortexe a doplniť do 18 ml pufrom. Vzorku nechať hydrolyzovať cez noc v termostate pri 37°C.

Na druhý deň upraviť pH na 3,0 a pridať 10 ml hexánu, dôkladne homogenizovať na vortexe (20 – 30s), centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Hexánovú vrstvu odstrániť, vo vodnej vrstve upraviť pH na 6,0 pomocou 5 mol/l NaOH a ak je to potrebné, doplniť vodou do 18 ml.

Mlieko

K 5 g mlieka pridať 6 ml pufru (pH 3,0), 1 ml roztoku proteázy, 25 μl zmesi interných štandardov a upraviť pH na hodnotu 3,0 pomocou 25% HCl a poriadne premiešať. Doplniť pufrom na objem 18 ml a premiešať. Vzorku nechať hydrolyzovať cez noc v termostate pri 37°C.

Na druhý deň centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C, preliať do čistej centrifugačnej skúmavky, skontrolovať pH a prípadne ho upraviť na 3,0. K supernatantu pridať 10 ml hexánu, dôkladne premiešať na vortexe (20 – 30s), centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Vrchnú hexánovú vrstvu odstrániť, pH upraviť na 6,0 pomocou 5 mol/l NaOH a doplniť vodou do 18 ml.

Sérum

K 2,5 ml séra pridať 1 ml roztoku proteázy, 125 μl zmesi interných štandardov. Upraviť pH na hodnotu 3,0 pomocou 25% HCl, dôkladne premiešať na vortexe a doplniť do 18 ml pufrom (pH 3,0). Vzorku nechať hydrolyzovať cez noc v termostate pri 37°C.

Na druhý deň centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C, preliať do čistej centrifugačnej skúmavky, skontrolovať pH a prípadne ho upraviť na 3,0 pomocou 25% HCl. K supernatantu pridať 10 ml hexánu, dôkladne premiešať na vortexe (20 – 30s), centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Vrchnú hexánovú vrstvu odstrániť, pH upraviť na hodnotu 6,0 pomocou 5 mol/l NaOH a doplniť vodou do 18 ml.

Krmivo

K 2 g krmiva pridať 10 ml pufru (pH 3,0), 1 ml proteázy, 100 μl zmesi interných štandardov a dôkladne homogenizovať na vortexe. Následne upraviť pH na 3,0 pomocou 25% HCl a znova poriadne premiešať. Vzorku nechať hydrolyzovať cez noc v termostate pri 37°C.

Na druhý deň centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Supernatant zliať do čistej skúmavky a k sedimentu pridať 8 ml pufru (pH 3,0), opäť centrifugovať. Oba supernatanty spojiť a upraviť pH na 3,0. Znova poriadne premiešať. Následne pridať 10 ml hexánu, dôkladne homogenizovať na vortexe (20 – 30s), centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Hexánovú

vrstvu odstrániť a vo vodnej vrstve upraviť pH na hodnotu 6,0 pomocou 5 mol/l NaOH a doplniť vodou do 18 ml.

4.2.2 Extrakcia tuhou fázou

Pripravený roztok vzorky v množstve 18 ml priamo aplikovať na kolónky s náplňou Extrelut. Po 20 minútach ekvilibrácie pridať 20 ml zmesi etylacetát/tert. butylmetyléter (1:1, v/v). Po 15 minútach pridať 2-krát 20 ml zmesi etylacetát/tert. butylmetyléter (1:1, v/v), eluát zachytávať do 100 ml Erlenmayerovej banky a zakoncentrovať na vákuovej odparke na objem 0,5 ml pri 45°C. Koncentrát preniesť do 4 ml vialky, banku 2-krát vypláchnuť 0,5 ml tert. butylmetyléteru a odpariť slabým prúdom dusíka do sucha. Rozpustiť v 100 μl mobilnej fázy A, centrifugovať 5 min cez centrifugačný filter pri 14 000 ot/min a 5°C, preniesť do vialky s insertom a použiť na analýzu.

4.3 Podmienky LC-MS/MS merania

LC-MS/MS parametre	
LC kolóna:	dĺžka: 150 mm ID: 4 mm veľkosť častíc: 5 µm fáza: Inertsil ODS-2
LC predkolóna:	fáza: Inertsil ODS-2
prietok:	0,3 ml/min
mobilná fáza:	A: 10 mM mravčan amónny + acetonitril (9:1) B: 10 mM mravčan amónny + acetonitril (1:9)

5. Literatúra

Confirmatory method for the Determination of Nitroimidazoles in muscle with GC-MS, Bundesinstitut fur gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin

EuroResidue IV (conference on residues Drugs In Food, Veldhoven, 2000)

Confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in muscle and plasma with LC-MS/MS. Bundesinstitut fur gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin