CH 6.25. Stanovenie nesteroidných antiflogistík (NSAIDs) metódou LC-MS/MS

1. Určenie metódy

Metóda je určená na stanovenie nesteroidných antiflogistík (NSAIDs – Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) v krvi, mäse a v mlieku. V mäse, v mlieku a v krvi sa stanovujú tieto rezíduá: diclofenac, vedaprofen, naproxen, ketoprofen, meloxicam, flunixín, 5-hydroxyflunixín, kyselina tolfenamová, carprofen, phenylbutazón a oxyphenylbutazón.

2. Princíp metódy

Rezíduá nesteroidných antiflogistík sú stanovované v krvnom sére, v mäse a surovom kravskom mlieku. Po hydrolýze a extrakcii organickým rozpúšťadlom nasleduje prečistenie získaného extraktu na vhodnom SPE sorbente. Zahustený prečistený extrakt rezíduí NSAIDs sa analyzuje metódou LC-MS/MS.

3. Pomôcky

3.1 Prístroje a zariadenia

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

3.2 Chemikálie a roztoky

- izooktán, metanol, hexán, acetonitril, dietyléter, deionizovaná voda
- pufor (Na-acetate buffer; pH 5.0)
- enzým glukuronidáza-sulfatáza z *Helix pomatia*
- Kyselina askorbová 0,02M a 0,01M
- 1M HCl
- 0,9% NaCl
- Hexán:dietyléter, 1:1
- Acetonitril: metanol, 9:1

4. Pracovný postup

4.1 Mäso

K 2 g mäsa pridať 6 ml pufru (Na-acetate) s pH=5 a upraviť pH zmesi na hodnotu 4,5. Pridať 20 μl glukuronidázy, dôkladne premiešať a nechať hydrolyzovať 1 hodinu pri 37°C.

Po hydrolýze upraviť pH na hodnotu 1,5 – 2 pomocou HCl a pridať 5 ml acetonitrilu, premiešať na vortexe a centrifugovať 10 min pri 4000 ot/min a 4°C. Supernatant dekantovať do čistej centrifugačnej skúmavky a mäso znova 2x extrahovať 5 ml acetonitrilu a 1 ml octanového

pufru. Supernatanty zo všetkých 3 extrakcií spojiť a pridať k nim 5 ml hexánu. Zmes premiešať na vortexe a centrifugovať 5 min pri 3000 ot/min. Vrchnú hexánovú vrstvu vyhodiť do odpadu. Spodnú acetonitrilovú vrstvu znova premyť 5 ml hexánu, premiešať a centrifugovať 5 min pri 3000 ot/min. Vrchnú hexánovú vrstvu vyhodiť do odpadu.

Spodnú acetonitrilovú vrstvu odpariť dusíkom na objem cca 9 ml pri 50°C. K odparku pridať 5 ml 0,02M kyseliny askorbovej, premiešať na vortexe, vložiť na 20 s do ultrazvuku a centrifugovať 15 min pri 4000 ot/min a 4°C. V supernatante upraviť pH na hodnotu 3 a použiť ho na čistenie cez SPE kolónku.

Čistenie na SPE kolónke:

- čistenie kolónky: 2 ml hexán: dietyléter (1:1, v/v); sušiť pri plnom vákuu 10 min
- kondicionovanie kolónky: 2 ml metanol
- ekvilibrácia: 2 ml kyseliny askorbovej
- aplikácia vzoky: supernatant preniesť kvantitatívne
- preplach: 2 ml kyseliny askorbovej a následne 2 ml deionizovanej vody
- sušenie: pri plnom vákuu, najmenej 30 min
- elúcia: 2,5 ml hexán : dietyléter (1:1, v/v)
  5 ml acetonitril : metanol (9:1, v/v)

4.2 Mlieko

4 ml mlieka napipetovať do skúmavky, pridať 40 μl glukuronidázy, dôkladne premiešať a nechať hydrolyzovať 1 hodinu pri 37°C.

Potom pridať 6 ml acetonitrilu a 1 ml roztoku NaCl na precipitáciu bielkovín. Vzorku následne centrifugovať 10 min pri 3500 ot/min a 4°C, potom pridať k vodnej vrstve ďalšie 2 ml acetonitrilu na precipitáciu zvyšných bielkovín a vzorku opäť centrifugovať 10 min pri 3500 ot/min a 4°C. Zrazeninu vyhodiť.

Vodnú vrstvu dekantovať do 50 čistej skúmavky a upraviť pH na hodnotu 3 pridaním 1M HCl. Pridať 10 ml 0,02M kyseliny askorbovej a celé kvantitatívne preniesť na SPE kolónku.

Čistenie na SPE kolónke:

- čistenie kolónky: 2 ml hexán: dietyléter (1:1, v/v); sušiť pri plnom vákuu 10 min
- kondicionovanie kolónky: 2 ml metanol
- ekvilibrácia: 2 ml kyseliny askorbovej
- aplikácia vzoky: supernatant preniesť kvantitatívne
- preplach: 2 ml kyseliny askorbovej a následne 2 ml deionizovanej vody
- sušenie: pri plnom vákuu, najmenej 30 min

- elúcia: 2,5 ml hexán : dietyléter (1:1, v/v)
  5 ml acetonitril : metanol (9:1, v/v)

4.3 Krvné sérum

5 ml séra napipetovať do teflónovej skúmavky, upraviť pH na 3 pridaním 1M HCl a vzorku hydrolyzovať pri laboratórnej teplote 10 min. Napokon pridať 15 ml 0,01 M kyseliny askorbovej (pH 3) a vzorku kvantitatívne preniesť na SPE kolónku a prečistiť.

<u>Čistenie na SPE kolónke</u>:

- čistenie kolónky: 2 ml hexán: dietyléter (1:1, v/v); sušiť pri plnom vákuu 10 min
- kondicionovanie kolónky: 2 ml metanol
- ekvilibrácia: 2 ml kyseliny askorbovej, pH 3
- aplikácia vzoky: supernatant preniesť kvantitatívne
- preplach: 2 ml kyseliny askorbovej, pH 3
  2 ml deionizovanej vody
- sušenie: pri plnom vákuu, najmenej 20 min
- elúcia: 2,5 ml hexán : dietyléter (1:1, v/v)

4.4 Koncentrácia

Eluát odpariť prúdom dusíka na Turbo Vap odparke pri 50°C dosucha, pridať 100µl ACN:MeOH (9:1), prefiltrovať cez centrifugačný filter pri 14 000 ot/min a 5°C, preniesť do čistej vialky a použiť na stanovenie pomocou LC-MS/MS.

5. Podmienky merania

Kolóna: Inertsil ODS2 - (C_{18}), 15 cm x 4,0 mm, s predkolónkou INODS2.

Teplota kolóny: 35°C

Objem nástreku: 10 µl

Mobilná fáza: A- 0,001M Kyselina octová + Acetonitril (9+1)

B- Acetonitril

Prietok: 0,3 ml/min

6. Literatúra

CVU Berlin: Confirmatory method for the determination of acid NSAIDs in muscle, liver and kidney with LC-MS/MS. Version No.1 of April 2005.

CVU Berlin: Screening and confirmatory method for the determination of acid NSAIDs in milk with HPLC-DAD. Version No.3 of February 2002.

CVU Berlin: Screening and confirmatory method for the determination of acid NSAIDs in plasma with HPLC-DAD. Version No.3 of April 2001.