

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Johanna Reinik

**LC-MS analüüsimetoodika arendamine põletikuvastaste ainete
määramiseks loomsetes maatriksites**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad: Koit Herodes, PhD, Tartu Ülikool

Madis Leivits, DVM, Eesti Maailikool

Tartu 2022

LC-MS analüüsimetoodika arendamine põletikuvastaste ainete määramiseks loomsetes maatriksites

Töö eesmärk oli töötada välja madalate avastamispiiridega ja selektiivne LC-MS meetodika põletikuvastaste ainete jääkide määramiseks loomsetes maatriksites. Uuritavateks ühenditeks olid ibuprofeen, ketoprofeen, fluniksiin, firokoksiib, meloksikaam, karprofeen ja atsetaminofeen. Analüütide lahutamiseks kasutati pöördfaasvedelikkromatograafiat ja eluentidena metanooli ning heksafluoroisopropanooli baasil puhverlahust. Analüütide detekteerimiseks kasutati kolmekordse kvadрупooliga massispektromeetrit mitme ülemineku jälgimise režiimis. QuEChERS prooviettevalmistusmetoodika arendamisel kasutati kanamaksa proove. Töö raames saavutati uuritud seitsme analüüdi jaoks optimaalsed kromatograafilise lahutuse ja tundliku massispektromeetrilise detekteerimise tingimused. Proovidest analüütide määramise saagised jäid vahemikku 53-78%.

Märksõnad: LC-MS, mittesteroidne põletikuvastane ravim, NSAID, maks, röövlind, QuEChERS

CERCS: P300, Analüütiline keemia

Development of LC-MS method for the analysis of anti-inflammatory drug residues in samples of animal origin

The aim of this work was to develop a LC-MS method having low limits of detection and high selectivity for the analysis of NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drug) residues in samples of animal origin. The test compounds were acetaminophen, ibuprofen, ketoprofen, flunixin, firocoxib, meloxicam and carprofen. Reverse phase chromatography using methanol and hexafluoroisopropanol-based buffer solution was applied to separate the analytes. Triple quadrupole mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode was used for detecting the analytes. The QuEChERS method was used to prepare chicken liver samples. Optimal chromatographic separation and selective mass spectrometric detection conditions were obtained for the seven analytes studied. Recoveries of the analytes were in the range of 53-78%.

Keywords: LC-MS, nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID, liver, predatory bird, QuEChERS

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
1. Sissejuhatus	7
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1. Põletikuvastased ained ja nende ringkäik looduses.....	8
2.2. Põletikuvastaste ravimite analüüsiks kasutatavad meetodid.....	9
2.3. Proovi ettevalmistus	10
2.3.1. Tahke-vedelik ekstraktsioon (SLE)	10
2.3.2. Ensümaatiline hüdrolyüs.....	11
2.3.3. Tahkefaasi ekstraktsioon (SPE)	11
2.3.4. Vedelik-vedelik ekstraktsioon (LLE)	11
2.3.5. Geelkromatograafia.....	12
2.3.6. QuEChERS	12
2.4. Instrumentaalanalüüs.....	13
2.4.1. Vedelikkromatograafia-massispektromeetria (LC-MS)	13
2.4.2. Ultrakõrge rõhu vedelikkromatograafia kõrglahutusega massispektromeetrilise detektoriga (UHPLC-HRMS).....	14
2.4.3. Muud võimalikud meetodid.....	14
2.4.4. Eluendi valik	14
3. Eksperimentaalne osa	16
3.1. Uuritavad põletikuvastased ravimid ja kasutatud kemikaalid.....	16
3.2. Lahuste valmistamine.....	16
3.3. Aparatuur.....	18
3.4. Proovide ettevalmistus	18
3.5. Vedelikkromatograafia parameetrid.....	19

4. Tulemused ja arutelu	21
4.1. Vedelikkromatograafia lahutus	21
4.2. Massispektrometria parameetrid	23
4.3. Kalibreerimine.....	24
4.4. Proovi ettevalmistus	25
5. Kokkuvõte.....	36
6. Summary.....	37
7. Kasutatud kirjandus.....	38
8. Lisa	40

Kasutatud lühendid

ACE (ingl *acetaminophen*) – atsetaminofeen

BE (ingl *back extraction*) – tagasiekstraktsioon

CAR (ingl *carprofen*) – karprofeen

DLLME (ingl *dispersive liquid-liquid microextraction*) – dispersiivne vedelik-vedelik mikroekstraktsioon

DLLME-BE (ingl *dispersive liquid-liquid microextraction back extraction*) – dispersiivne vedelik-vedelik mikroekstraktsioon tagasiekstraktsiooniga

dMRM (ingl *dynamic multiple reaction monitoring*) – dünaamiline mitme ülemineku jälgimine

DMSO – dimetüülsulfoksiid

FIR (ingl *firocoxib*) – firokoksiib

FLU (ingl *flunixin*) – fluniksiin

GC (ingl *gas chromatography*) – gaasikromatograafia

IBU (ingl *ibuprofen*) – ibuprofeen

KET (ingl *ketoprofen*) – ketoprofeen

LC-MS (ingl *liquid chromatography mass-spectrometry*) – vedelikkromatograafia-massispektromeetria

LLE (ingl *liquid-liquid extraction*) – vedelik-vedelik ekstraktsioon

MEL (ingl *meloxicam*) – meloksikaam

M_{mi} – monoisotoopne mass

MRM (ingl *multiple reaction monitoring*) – mitme ülemineku jälgimine

NSAID (ingl *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) – mittesteroidne põletikuvastane ravim

PSA (ingl *primary secondary amine*) – primaarne-sekundaarne amiin

QuEChERS (ingl *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) – proovi ettevalmistuse meetod

SLE (ingl *solid-liquid extraction*) – tahke-vedelik ekstaktsioon

SPE (ingl *solid phase extraction*) – tahkefaasi ekstraktsioon

UHPLC-HRMS (ingl *ultra high pressure liquid chromatography - high resolution mass-spectrometry*) - ultra kõrgrõhu vedelikkromatograafia kõrglahutusega massispektromeetria

1. Sissejuhatus

Käesoleva bakalaureusetöö teemaks on massispektromeetrilise detekteerimisega vedelikkromatograafial (LC-MS) baseeruva analüüsimetoodika arendamine põletikuvastaste ravimite määramiseks loomsetest maatriksitest. Teematika arendamine on tähtis, sest põletikuvastaste ainete jääkide sisaldust linnu maksas võib lugeda üheks keskkonna puhtuse indikaatoriks. Need ühendid akumuluvad röövlindude maksas läbi väiksemate loomade ja putukate tarbimise, kelle organismi on ravimijäägid omakorda jõudnud inimeste tekitatud tootmise ja kasutamise jääkidest. Põletikuvastaste ainete jäägid võivad kujutada endast tõsist ohtu elusorganismide, sealhulgas röövlindude tervisele.

Instrumentaalanalüüsil põletikuvastaste ainete detekteerimiseks on eelistatud LC-MS meetod. Pöördfaasvedelikkromatograafia sobib põletikuvastaste ainete määramiseks. Meetod võimaldab segust lahutada mitmeid analüüte. Massispektrometria on piisavalt tundlik ja selektiivne, et eristada analüüte proovi ekstraktis.

Põletikuvastaste ainete analüüsiks kasutatavaid proovi ettevalmistusmeetodeid on mitmeid, näiteks QuEChERS-i meetod, tahke-vedelik ekstraktsioon, tahkefaasi ekstraktsioon jne. Ükski neist ei ole oma klassikalises versioonis päris sobilik, kuid mõningate modifikatsioonide tegemisel saab nende proovi ettevalmistusmeetoditega vajalikud analüüdid eraldatud.

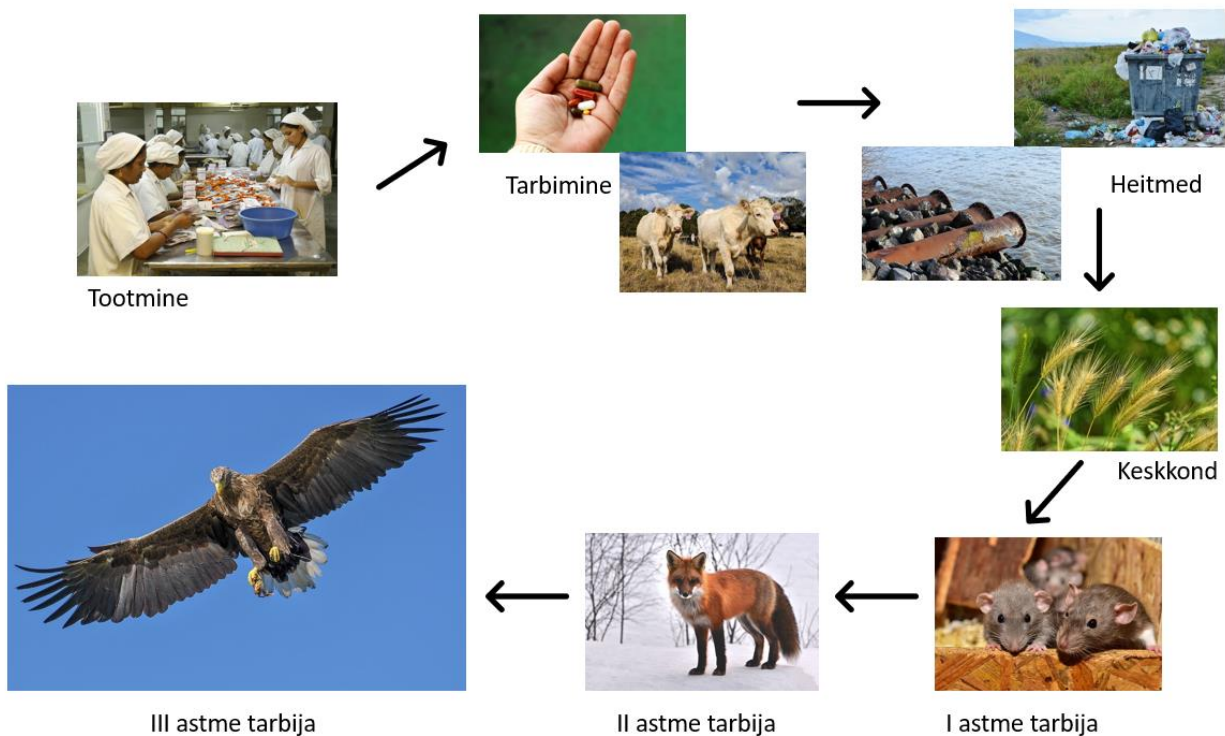
Töö eesmärk on töötada välja madalate avastamispiiridega ja selektiivne LC-MS metoodika põletikuvastaste ainete jääkide määramiseks lindude kudedes. Töö käigus valitakse välja sobiv proovi ettevalmistusmeetod, analüütiline kolonn ja tingimused LC-MS analüüsiks. Koostatud esialgse metoodika baasil töötatakse tulevikus välja, optimeeritakse ja valideeritakse analüüsimetoodika reaalse proovide analüüsiks.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Põletikuvastased ained ja nende ringkäik looduses

Mittesteroidne põletikuvastane aine ehk NSAID (ingl *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) on sünteetiline aine, mis inhibeerib tsüklooksügenaasi ensüümi. Tsüklooksügenaas on vajalik arahhidoonhappe muundamiseks tromboksaanideks, prostaglandiinideks ja prostatsükliinideks. NSAID-e kasutatakse nii inimeste kui loomade raviks ja neid tarvitatakse palaviku alandamiseks, valu leevendamiseks ja põletike vähendamiseks. Enim kasutatud NSAID-id on näiteks ibuprofeen ja aspiriin.¹

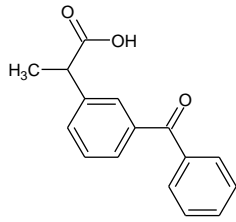
Põletikuvastased ained võivad sattuda keskkonda nii tootmisel kui ka kasutamisel tekkinud heitmetena. Esmalt satuvad jäägid näiteks heitvette ja selle kaudu pinnasesse ning sealt omakorda ringiga loomadeni. Röövlindude kudedesse jõuavad põletikuvastased ained eelkõige sellest, et linnud söövad nende ühendite jääke tarbinud väikeloomi. Röövlinnu organismi sattunud põletikuvastased ained võivad akumulereuda erinevates loomsetes kudedes, näiteks maksas või rasvkoes. Põletikuvastaste ainete jääkide sisaldused loomsetes kudedes on sobilikud hindama keskkonna saastatust. Joonisel 1 on skemaatiliselt näidatud põletikuvastaste ainete levimine keskkonnas. Cuthbert *et al* artiklis² on toodud andmed mitmete NSAID-ide toksilisuse kohta erinevatele linnuliikidele. Uuringus selgus, et NSAID-idest karprofeen, fluniksiin ja ibuprofeen, osutusid surmavaks näiteks röövlindudele, kurgedele ja öökullidele samas meloksikaam lindude surmasid ei põhjustanud. Käesolevas töös uuritud NSAID-ide ja atsetaminofeeni struktuurvalemid on esitatud joonisel 2.



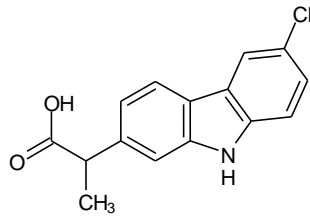
Joonis 1 Põletikuvastaste ainete levimine keskkonnas. (Fotode allikas: pixabay.com)

2.2. Põletikuvastaste ravimite analüüsiks kasutatavad meetodid

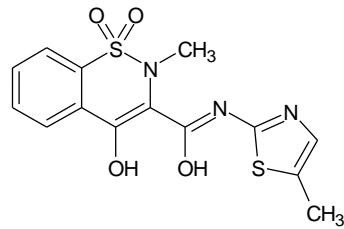
Tegemist on keeruka analüüsiga, sest otsitakse väga madalaid uuritavate ainete sisaldusi loomsetes maatriksites. Analüüs koosneb proovi ettevalmistusest, mis omakorda võib olla mitme-etapiline ning aparatuursest lõppmääramisest. Proovide ettevalmistuseks on kasutusel erinevad meetodid, mis võivad olla küllaltki ajamahukad. Lõppmääramiseks kasutatakse tänapäeval kõige enam LC-MS meetodit.



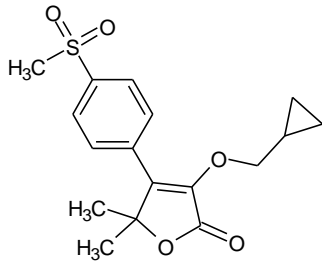
Ketoprofeen, $M_{mi} = 254,1$



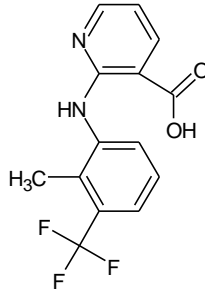
Karprofeen, $M_{mi} = 273,1$



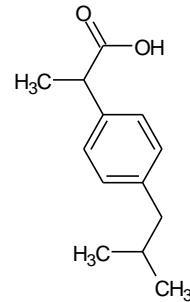
Meloksikaam, $M_{mi} = 351,0$



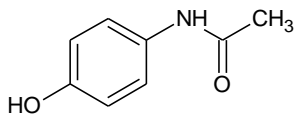
Firokosiib, $M_{mi} = 336,1$



Fluniksiin, $M_{mi} = 296,1$



Ibuprofeen, $M_{mi} = 206,1$



Atsetaminofeen, $M_{mi} = 151,1$

Joonis 2 Uuritud analüütide struktuurvalemid ja monoisotoopsed molekulmassid (M_{mi}).

2.3. Proovi ettevalmistus

Proovi ettevalmistuse eesmärk on võimalikult täielikult ekstraheerida analüüdid maatriksist, eraldades need samas maatriksi komponentidest. Välja on pakutud eri meetodeid, millest kõigil on oma eelised ja puudused.

2.3.1. Tahke-vedelik ekstraktsioon (SLE)

Hu *et al*³ töötas välja meetodika, millega määrati 30 NSAID-i sisaldusi sealihhas, kasutades UHPLC-MS/MS instrumenti. Proovi ettevalmistus viidi läbi tahke-vedelik ekstraktsiooniga ehk SLE-ga (ingl *solid-liquid extraction*). Selle käigus lisati homogeniseeritud proovile atsetonitriili ja fosforhappe segu ning veevaba naatriumsulfaati. Ekstraktsiooni tulemusena jäid uuritavad

ühendid ekstraheeriva lahusti fraktsiooni. Ekstraheeriv lahusti eraldati aurustati, proov lahustati eluendis ja sisestati LC-MS-i. Meetodit kontrolliti 30 erineva NSAID-i määramiseks kolmel kontsentratsioonitasemel. Keskmised saagised olid 62-125%.³

2.3.2. Ensümaatilise hüdrolüüsi

Kuueteistkümne NSAID-i analüüsiks proovi ettevalmistusel oli kasutatud abietapina ensümaatilist hüdrolüüsi. Proovi ettevalmistusel lisati ekstraktile beeta-glükuronidaasi ja hoiti 15 minutit 37°C juures. Lisatud ensüüm vabastas analüüdi metabolismi käigus tekkinud glükuroniidist, mistõttu ühendi ekstraktsioon maatriksist paranes. Autorite sõnul oli ensümaatilise hüdrolüüsi eeliseks selle kiirus ja saadud ekstraktid olid puhtad. Ensümaatilise hüdrolüüsi oli osutunud selektiivseks meetodiks ning seda oli võimalik küllaltki lühikese aja jooksul läbi viia. Enamikel ühenditel olid piisavalt kõrged saagised, alates 75%. Madalamaid saagiseid, alates 36% andsid nifluumhape ja flufenaamhape ning üle 100% saagise andis atsetüülaminofenasoon. Puudusena toodi välja võimalikud interaktsioonid proovi maatriksi komponentidega.⁴

2.3.3. Tahkefaasi ekstraktsioon (SPE)

Tahkefaasi ekstraktsioon ehk SPE (ingl *solid phase extraction*) on üks enam kasutatavaid loomsete proovide ettevalmistusmeetodeid, mida on kasutatud ka veterinaarravimite jääkide, seahulgas NSAID-ide analüüsiks proovide ettevalmistusel. Antud meetodi puhul viiakse proovi ekstrakt eelkonditsioneeritud tahkefaasi kolonni. Kolonnist elueeritakse välja analüüsil mittesoovitavad ühendid ja viimase etapina elueeritakse uuritavad ained teise solventiga kolonnist välja. Selle meetodi eelised on väike solventikulu, odavus ja kiirus. Vaatamata meetodi paljudele headele omadustele võib ette tulla ka puudusi, näiteks maatriksefektidest tingitud liiga madalad või kõrged saagised. Probleeme võib esineda ka selektiivsuse ja korratavusega. Nendest puudustest ülesaamiseks on kasutatud täiendavaid SPE versioone, näiteks online SPE ja MIP SPE (ingl *molecularly imprinted SPE*).⁵

2.3.4. Vedelik-vedelik ekstraktsioon (LLE)

Vedelik-vedelik ekstraktsioon ehk LLE (ingl *liquid-liquid extraction*) on klassikaline meetod loomsete ja kõrge rasvasisaldusega proovide analüüsiks. Selle meetodi puudus on suur hulk käsitsi tööd, ajakulu, võimalik emulsiooni teke ja suur solventide kulu. Tihti ei saa LLE-ga proove piisavalt puhtaks ja lisaks tuleb kaasata veel üks ekstraktsioonietapp, näiteks SPE.⁵

Seetõttu on viimastel aastatel kasutusele võetud teised meetodid. Tänapäeval on kasutusel ka LLE keskkonnasõbralikum edasiarendus DLLME ehk dispersiivne vedelik-vedelik mikroekstraktsioon. Meetod põhineb kolmest erinevast vedelfaasist koosneva süsteemi tekitamisel. Esimene faas on analüüte sisaldav vesilahus, teine on vees mittelahustuv ekstraktsioonisolvent ja kolmas on vesilahustuv dispersioonisolvent. Ekstraktsioonisolvent segatakse dispersioonisolvendiga, millesse kiiresti süstitakse analüüte sisaldav ekstrakt. Saadud segu muutub häguseks, ehk ekstraktsiooni solvent disperseerub. Segu tsentrifuugitakse ja uuritavad ained jäävad ekstraktsioonisolvendi faasi. Selle meetodi eelis on väike solvendikogus.⁶

Ghambarian *et al.* artiklis prooviti kasutada NSAID-ide määramiseks proovide ettevalmistusel tavalist DLLME-d, kus solvendisüsteemi moodustasid vesi, atsetoon ja dodekaan. Proovi ettevalmistus oli küll kiire, kuid proovi ekstraktid jäid liiga mustaks. Seetõttu lisati ekstraktsioonile täiendav tagasi-ekstraktsiooni etapp ehk BE (*ingl back extraction*), mille käigus uuritavad ühendid viidi metanooli lahusesse. DLLME-BE-ga (*ingl dispersive liquid-liquid microextraction back extraction*) saadud ekstraktid olid oluliselt puhtamad, võrreldes tavalise DLLME-ga.⁷

2.3.5. Geelkromatograafia

Geelkromatograafia (*ingl gel-permeation chromatography*) on üks suuruseralduskromatograafia alaliike, kus meetod põhineb segu komponentide eraldamisel nende molekulide suuruse järgi. Meetod võimaldab puhastada proovi ekstrakt analüüsi segavatest maatriksis leiduvatest ühenditest, näiteks rasvadest ja valkudest.⁵ Geelkromatograafiat on jääkide ja saasteainete määramisel ekstraktide puhastamiseks küllalt harva kasutatud. Näiteks üheksa koktsidiostaatikumi analüüsil munadest saavutati ekstraktide geelkromatograafilise puhastuse ja LC-MS analüüsi järel avastamispiirid alla 1 µg/kg ja saagised 30-85%.⁸

2.3.6. QuEChERS

QuEChERS-i (*ingl quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*) meetod on viimastel aegadel laialdaselt kasutusel erinevate proovide ettevalmistuseks saasteainete analüüsiks. Esmalt toimub tahke-vedelik ekstraktsioon atsetonitriili abil. Ekstraktsioonisegule lisatakse magneesiumsulfaati, naatriumkloriidi vee sidumiseks, et kergesti eraldada vee- ja solvendikiht. Seejärel ained segatakse ning tsentrifuugitakse ja ekstrakt puhastatakse dispersiivse tahkefaasi ekstraktsiooniga. Analüüte sisaldav solvendikiht viiakse üle kromatograafi viaali. Varem kasutusel olnud

analüüsimeetoditega võrreldes on QuEChERS kasulik selle poolest, et kasutatavad reaktiivid on ohutumad ja solvendi kogused väiksed. Lisaks on tegu odava ja kiire proovi ettevalmistusmeetodiga, mis ei nõua keerulist aparatuuri. Algne taimsete maatriksite analüüsiks mõeldud QuEChERS-i meetod ei ole sobiv loomsete proovide analüüsiks. Ometi on tehtud algsele QuEChERS-i meetodile palju modifikatsioone, et oleks võimalik leida analüüte ka rasvastest ja loomsetest maatriksitest.⁹

Loomsete proovide puhul tuleb seda meetodit modifitseerida, sest nendel maatriksitel on küllaltki kõrge maatriksiefekt. Maatriksiefekt on proovi materjalist tingitud analüütilise signaali muutus võrreldes kalibreerimislahustega. Maatriksiefektide minimeerimiseks on välja pakutud proovile näiteks atsetooni lisamine, happeline või ensümaatilise hüdrolyüsi. Lisapuhastuseks on kasutusel PSA (ingl *primary secondary amine*) ja/või C18 sorbendi lisamine.⁵

2.4. Instrumentaalanalüüs

2.4.1. Vedelikkromatograafia-massispektrometria (LC-MS)

Valdavas osas on põletikuvastaste ravimite analüüsiks kasutusel vedelikkromatograafilised meetodid, eelistatult LC-MS, mis tagab piisava tundlikkuse ja selektiivsuse. Vedelikkromatograafi kolonnis toimub analüütide lahutamine ülejäänud ühenditest. Kolonnist elueerunud proovi komponendid suunatakse mass-selektiivsesse detektorisse, kus toimub ionisatsioon. Ioonid lahutatakse massi ja laengu suhete põhjal ning registreeritakse.

Kang *et al.* artiklis¹⁰ töötati välja veise-, sea- ja kanamaksas NSAID-ide määramiseks analüüsimeetod. Tegu oli LC-MS/MS-i meetodiga, milles kasutati analüütilist kolonni Acquity UPLC BEH C18, pöördfaas kromatograafia kolonni, mille statsionaarseks faasiks oli oktaadetsüülsilüül-modifitseeritud silikageel. Välja pakutud meetodit valideeriti kümne NSAID-iga, milleks olid atsetüülsalitsüülhape, paratsetamool, fluniksiin, karprofeen, ketoprofeen, meloksikaam, diklofenak, tolfenaamhape, fenüülbutasoon ja oksüfenüülbutasoon kolme maatriksiga, milleks olid veise-, sea- ja kanamaks. Keskmised saagise vahemikud olid 72-100%. Kõige madalam saagis oli oksüfenüülbutasoonil, mis oli 52% ja kõige kõrgem saagis oli meloksikaamil, mis oli 100%.

Jedziniaki *et al.* artiklis⁴ töötati välja NSAID-ide määramiseks LC-MS skriining-meetod. Proovid valmistati ette ensümaatilise hüdrolüüsiga ja vedelik-vedelik ekstraktsiooniga. 25 NSAID-i eraldati kromatograafiliselt Luna C18 kolonnis. Tegu oli C18 pöördfaasi kolonniga.

Dubreil-Chéneau *et al.* artiklis¹¹ leiti 12 NSAID-i sisaldus piimas, mille hulgas olid ka meloksikaam, fluniksiin, karprofeen ja ketoprofeen. Kasutati C18 kolonni ja gradiendi meetodit, kus eluendi komponentideks olid 1 mM etaanhappevesilahus ja atsetonitril. Ainete aksepteeritav lahutus saavutati 23 minuti jooksul, kuigi piigid ei olnud täielikult lahutatud.

2.4.2. Ultrakõrge rõhu vedelikkromatograafia kõrglahutusega massispektromeetrilise detektoriga (UHPLC-HRMS)

Pugajeva *et al.* artiklis¹² töötati välja ultrakõrge rõhu vedelikkromatograafiline kõrglahutusega massispektromeetriline ehk UHPLC-HRMS meetod 164 farmakoloogiliselt aktiivse aine ning nende metaboliitide määramiseks lihaproovides. Uurimuses kasutati Phenomenex Luna Omega kolonni ja detekteeriti nii positiivse kui ka negatiivse ioonisatsiooni režiimis. Meetod valideeriti mitme eri lihamaatriksiga ning saadi autorite hinnangul aktsepteeritavad tulemused toiduproovide ametlike kontrollanalüüside teostamiseks. Määramispiir jäi 0,03 kuni 0,67 pg vahemikku (väljendatud süsteemi sisestatud kogusena).

2.4.3. Muud võimalikud meetodid

Kromatograafia liikidest on varem kasutusel olnud ka gaasikromatograafia ehk GC. Tänapäeval seda üldiselt ei eelistata, sest enamik põletikuvastaseid ravimeid ei ole piisavalt lenduvad ja võivad laguneda kõrgetel temperatuuridel.¹³

Kapillaarelektroforees on samuti alternatiiv põletikuvastaste ravimite määramiseks, kuid praktikas kasutatakse seda vähe.¹³

2.4.4. Eluendi valik

Põletikuvastaste ainete eraldamisel kasutatakse enamasti pöördfaaskromatograafia kolonne. Antibiootikumidest umbes 70% on aluselised, kuid leidub ka happelisi ühendeid ligikaudu 20% ulatuses.¹⁴ Ka NSAID-e on nii happeliste kui aluseliste omadustega. Aluseliste ühendite eraldamine pöördfaaskolonnis madalal pH-l on tihti raskendatud analüütide ja kolonni materjalis leiduvate silanoolgruppide interaktsioonide tõttu. Silanoolgrupid võivad põhjustada piigi kuju halvenemist ning probleeme analüütide retentsiooni ja kolonnidevaheliste tulemuste

korratavusega.¹⁵ Vedelikkromatograafias sisaldab mobiilne faas lisaks põhikomponentidele ka lisandeid või puhvreid, mis võimaldavad muuta analüütide eraldamise tingimusi. pH jaioonjõud mõjutavad mitte ainult analüüdi retentsiooni, vaid ka ionisatsiooni massispektromeetri ionallikas. pH muutub eriti oluliseks, kui samaaegselt analüüsitakse nii happeliste kui ka aluseliste funktsionaalsete rühmadega ühendeid. Mobiilse faasi pH määrab analüütide protoneerituse.¹⁶ LC-MS analüüsidel kasutatavad puhverlahused ei tohi alla suruda analüütide ionisatsiooni ja peavad olema lenduvad. Mittelenduvate ühendite kasutamine võib saastada ionisatsiooniallikat.¹⁵

Aluselised analüüdid on protoneeritud, kui eluendi pH on madalam kui analüüdi pK_a väärtus, mistõttu nendel ühenditel on pöördfaaskolonnides vähene retentsioon. Selle parandamiseks võib kasutada vedelikkromatograafias eluendi lisandina fluoroalkohole aluseliste lahuste puhul. Fluoroalkoholid seonduvad tugevalt hüdrofoobse statsionaarse faasiga ja tekitavad hüdrofiilse pealiskihi. Fluoroalkoholide anioonid moodustavad mobiilses faasis ionipaare protoneeritud alustega, mis suurendab juba muudetud statsionaarsel faasil analüütide retentsiooni. Happelised ühendid peavad võistleva fluoroalkoholidega statsionaarse faasi pinna eest, mis kiirendab nende elueerumist.¹⁷ Eluendi puhverlahuse komponendina on HFIP näidanud tundlikkuse ja selektiivsuse paranemist LC-MS analüüsis.¹⁶

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Uuritavad põletikuvastased ravimid ja kasutatud kemikaalid

Standardlahuste valmistamiseks osteti tahked põletikuvastaste ainete preparaadid. Lahused valmistati järgmiste analüütidega: ibuprofeen (CAS 15687-27-1, puhtus 99,9%), ketoprofeen (CAS 22071-15-4, puhtus 99,9%), karprofeen (CAS 53716-49-7, puhtus 99,7%), firokoksiib (CAS 189954-96-9, puhtus 99,8%), atsetaminofeen (CAS 103-90-2, puhtus 100,2%), fluniksiin (CAS 38677-85-9, puhtus 99,9%) ja meloksikaam (CAS 71125-38-7). Kõikide põletikuvastaste ainete tootja oli Sigma-Aldrich, va meloksikaami, mille tootja oli European Pharmacopoeia Reference Standards.

Töös kasutati järgmisi kemikaale: metanool (CAS 67-56-1, tootja Honeywell, puhtus $\geq 99,9\%$, LC-MS puhtus), atsetonitriil (CAS 75-05-8, tootja Honeywell, puhtus $\geq 99,9\%$, LC-MS puhtus), DMSO (dimetüülsulfoksiid), kontsentreeritud sipelghape (CAS 64-18-6, tootja Honeywell, puhtus $\geq 98\%$), QuEChERS-i soolade segu (naatriumsulfaat, naatriumkloriid, trinaatrium tsitraat dihidraat, dinaatrium vesiniktsitraat seskivihürdaat), PSA (ingl *primary secondary amine*), MilliQ vesi (MilliQ Advantage A10, Millipore).

Vedelikkromatograafias elueerimisel kasutati eluentidena metanooli ja heksafluoro-2-propanooli (HFIP) baasil puhverlahust (5 mM, pH = 9 kasutades ammoniaagilahust).

3.2. Lahuste valmistamine

Metanool-vesi (15+85) lahuse valmistamiseks segati 15 ml metanooli ja 85 ml MilliQ vett.

Atsetonitriil-vesi (1:1) lahuse valmistamiseks segati 50 ml atsetonitriili ja 50 ml MilliQ vett.

Metanool-atsetonitriil-vesi (1:1:2) lahuse valmistamiseks segati 35 ml atsetonitriili, 35 ml metanooli ja 70 ml MilliQ vett.

Iga analüüdiga valmistati eraldi lahused kontsentratsiooniga umbes 1 mg/ml. Lahuste täpne koostis on esitatud tabelis 1. Ibuprofeeni, ketoprofeeni ja atsetaminofeeni puhul lisati täpselt kaalutud analüütidele 10 ml metanooli-atsetonitriili-vee segu. Fluniksiini, karprofeeni ja meloksikaami lahustuvuse parandamiseks lisati lisaks metanooli-atsetonitriili-vee segule sipelghape ja/või ammoniaaki ja/või DMSO-d. Firokoksiibi lahus valmistati DMSO-sse, kuna

preparaati oli vähe ja sooviti kindlustada aine täielik lahustumine. Saadud lahused filtreeriti kasutades Phenomenex RC (regeneereeritud tselluloos) süstlafiltrit, poori suurusega 0,2 µm.

Tabel 1 Analüütide põhilahused.

Analüüdi nimetus	Kaalatud mass (mg)	Lisatud MeOH-MeCN-vesi segu (ml)	Lisatud sipelghappe lahust (µl)	Lisatud ammoniaagi lahust (µl)	Lisatud DMSO lahust (ml)
Atsetaminofeen	10,43	10	-	-	-
Ibuprofeen	9,80	10	-	-	-
Firokoksiib	8,11	-	-	-	8
Fluniksiin	10,19	10	-	500	-
Karprofeen	9,90	10	-	500	-
Ketoprofeen	10,00	10	-	-	-
Meloksikaam	9,30	10	110	-	1

Tööstandardlahuse valmistamiseks võeti igast põhilahusest kogus, mis oli vajalik 1 mg/l kontsentratsiooniga standardlahuse saamiseks. 50 ml mahtkolbi võeti 1,020 ml ibuprofeeni, 1 ml ketoprofeeni, 1,010 ml karprofeeni, 0,981 ml fluniksiini, 1,233 ml firokoksiibi, 1,075 ml meloksikaami ja 0,959 ml atsetaminofeeni lahust. Kolb täideti metanooli-atsetonitrili-vee seguga märgini, loksutati ja saadud lahuse kontsentratsioon oli kõigi analüütide suhtes 20 mg/l. Valmistatud lahust võeti 50 µl ja lahjendati ühe milliliitrini metanooli-atsetonitrili-vee seguga ja saadi lahus kontsentratsiooniga 1 mg/l.

Kalibreerimisgraafikute koostamiseks valmistati kuus erineva kontsentratsiooniga standardlahust. Esimene kalibreerimislahus ($c = 50 \mu\text{g/l}$) valmistati kasutades 50 µl tööstandardlahust ja 950 µl HFIP puhverlahust. Teine kalibreerimislahus ($c = 25 \mu\text{g/l}$) valmistati kasutades 25 µl tööstandardlahust ja 1000 µl HFIP-i. Seejärel tehti tööstandardlahusele 10-kordne lahjendus, võttes 100 µl tööstandardlahust ja 900 µl HFIP-i ning saadud kontsentratsioon oli 100 µg/ml. Kolmas kalibreerimislahus ($c = 10 \mu\text{g/l}$) valmistati kasutades 100 µl lahjendatud tööstandardlahust ja 1000 µl HFIP-i. Neljas kalibreerimislahus ($c = 5 \mu\text{g/l}$) valmistati kasutades 50 µl lahjendatud tööstandardlahust ja 1000 µl HFIP-i. Viies kalibreerimislahus ($c = 1 \mu\text{g/l}$) valmistati kasutades 10 µl lahjendatud tööstandardlahust ja 1000 µl HFIP-i. Kuues

kalibreerimislahus ($c = 0,5 \mu\text{g/l}$) valmistati kasutades 5 μl lahjendatud tööstandardlahust ja 1000 μl HFIP-i.

3.3. Aparatuur

LC-MS analüüs viidi läbi kasutades Agilent Technologies 1290 Infinity II – Triple Quad LC/MS instrumenti. Massispektromeetiline analüüs viidi läbi nii positiivses kui ka negatiivses ioonide režiimis. Töös kasutati kolonni X Bridge Shield RP 18, mille pikkus oli 15 cm, diameeter oli 3 mm ja täidiseosakeste suurus 3,5 μm .

Andmetöötamiseks kasutati Agilent MassHunter Quantitative Analysis (for QQQ) tarkvaraprogrammi.

3.4. Proovide ettevalmistus

Töös läbi viidud proovi ettevalmistus baseerus Desmarchelier *et al.* artiklis¹⁸ kasutatud proovi ettevalmistuse meetodil, mida modifitseeriti vähesel määral.

Lisamiskatsete maatriksiks võeti broileri maks, mis homogeniseeriti köögikombainis ja saadud püree külmutati. Proovi ettevalmistusel kaaluti kaks $1 \pm 0,05$ g külmutatud maksa alikvooti 50 ml polüpropüleenist tuubidesse. Esimese tuubi sisule ei lisatud midagi, aga teise tuubi sisule lisati 100 μl rikastamislahust (*spike*) kontsentratsiooniga 1 mg/l (vastab 50 $\mu\text{g/kg}$ kontsentratsioonile proovis).

Röövlinde kudede NSAID-ide sisaldusele ei ole kehtestatud piirnorme, seetõttu valiti meetodi väljatöötamiseks 50 $\mu\text{g/kg}$ kontsentratsioon lähtuvalt Euroopa Liidus kehtivatest piirnormidest loomsetes maatriksites.

Komisjoni määruse (EL) nr 37/2010, mis käsitleb farmakoloogilisi toimeaineid ja nende liigitust loomsetes toiduainetes sisalduvate jääkide piirnormide järgi, on kehtestatud piirsisaldused firokosiibile, fluniksiinile, karprofeenile ja meloksikaamile, mis jäävad loomade maksa puhul 60-300 $\mu\text{g/kg}$ ning lihaskoe puhul 10-500 $\mu\text{g/kg}$ vahemikku.¹⁹

Tabel 2 Ettevalmistatud proovid.

Proovi nimetus	Kaalutud proovi mass (g)	Lisatud rikastamislahust (<i>spike</i>)
Proov 1.1	0,95955	ei
Proov 1.2	1,00833	jah
Proov 2.1	1,01096	ei
Proov 2.2	1,02000	jah
Proov 3.1	0,95742	ei
Proov 3.2	0,95840	jah
Proov 4.1	1,02710	ei
Proov 4.2	1,03550	jah

Ekstraheerimiseks lisati 8 ml MilliQ vett ja segu loksutati 1500 rpm-i juures 3 minutit. Saadi homogeenne segu. Lisati 30 ml atsetonitriili-vee (1:1) segu ja 30 µl kontsentreeritud sipelghapet ning segu loksutati 1500 rpm-i juures 1,5 minutit. Lisati QuEChERS-i sooladesegu, mis sisaldas 4 g Na₂SO₄, 1 g NaCl, 1 g trinaatrium tsitraat dihidraati ja 0,5 g dinaatrium vesiniktsitraat seskivihüdraati. Segu loksutati koheselt tükkide vältimiseks ja segati 1500 rpm-i juures 3 minutit. Seejärel lahust tsentrifuugiti 4000 rpm juures 10 minutit.

Kuus ml saadud ekstrakti viidi üle 15 ml polüpropüleenist tuubi, kuhu oli varem lisatud 600 mg Mg₂SO₄, 200 mg C18 ja 200 mg PSA segu. Lahust raputati tükkide tekkimise vältimiseks ja loksutati 1500 rpm-i juures 3 minutit. Segu tsentrifuugiti 4000 rpm juures 10 minutit.

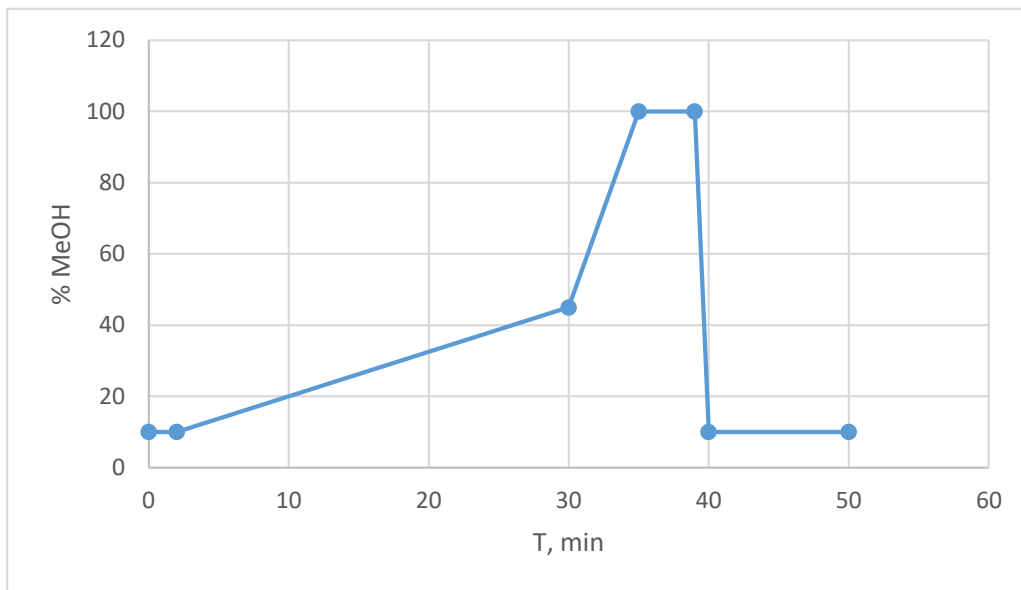
Saadud ekstraktist 0,5 ml lahust viidi üle LC-MS viaali ja sellele lisati 0,5 ml HFIP puhverlahust. Lahus filtreeriti teise LC-MS viaali, kasutades Phenomenex RC süstlafiltrit, poori suurusega 0,2 µm.

3.5. Vedelikkromatograafia parameetrid

Vedelikkromatograafia meetodis kasutati elueerimiseks metanooli ja heksafluoroisopropanooli (HFIP) baasil puhverlahuse (5 mM, pH = 9) gradienti. Eluendi voolukiirus oli 0,3 ml/min, kolonni temperatuur 40°C ja süsti maht oli 5 µl. Sobilik gradient leiti optimeerimise abil ning on näidatud tabelis 3 ja joonisel 3.

Tabel 3 Töös kasutatud gradient.

Aeg (min)	MeOH (%)	pH 9 puhverlahus (%)
0	10	90
2	10	90
30	45	55
35	100	0
39	100	0
40	10	90
50	10	90



Joonis 3 Töös kasutatud gradient.

4. Tulemused ja arutelu

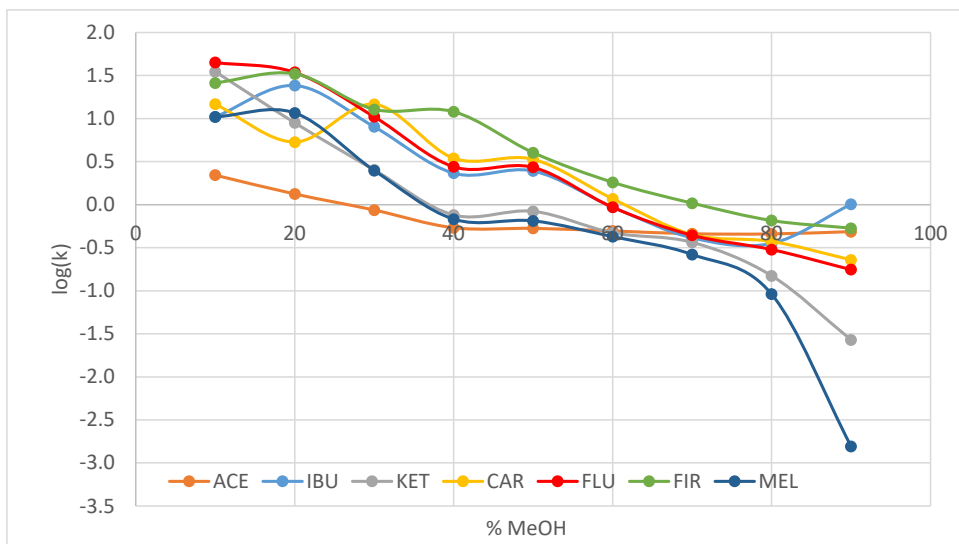
Analüüsimeetodi väljatöötamise käigus tegeleti eluendi koostise optimeerimisega, massispektrometri parameetrite optimeerimisega, teostati seitsme analüüdiga kalibreerimised ja lisamiskatsed.

4.1. Vedelikkromatograafia lahutus

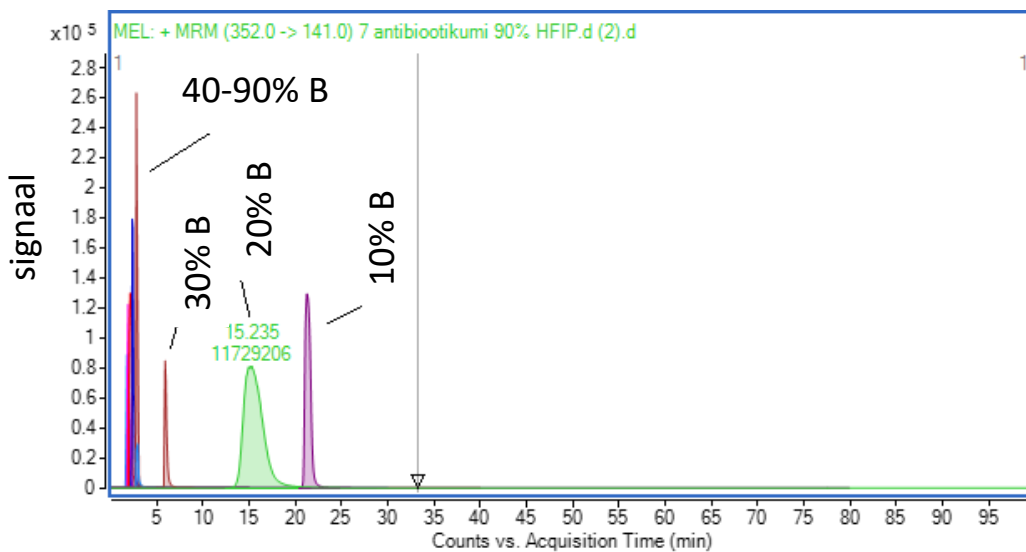
Töö käigus muudeti eluendi koostises oleva HFIP-i kontsentratsiooni eesmärgiga saavutada analüütide lahutuvus ja pikendada retentsiooniaegu. Retentsiooniajad sõltuvad orgaanilise faasi protsendist ja seda saab iseloomustada võrrandiga 1.²⁰

$$\log k = \log k_0 - S \cdot \%B \quad (1)$$

kus k on retentsioonifaktor, k_0 on retentsioon, kui orgaanilise solventi sisaldus oleks 0%, S on tõus ja $\%B$ on orgaanilise faasi sisaldus kümnendmurruna. Alustati eluendiga, mis koosnes 10% HFIP puhverlahusest ja 90% metanoolist. Järk-järgult langetati metanooli koostist kuni 10%-ni. Jooniselt 4 on näha, et kõrge metanooli ja madala HFIP-i sisalduse puhul analüüdid elueeruvad kiiresti ja nende retentsiooniajad on liiga lähestikku. Kui HFIP-i sisaldust tõsta ja metanooli sisaldust langetada, siis analüütide retentsiooniajad pikenevad, kuid soovitud piikide retentsioon saavutati alles 90% HFIP-i kontsentratsiooni juures. Algandmed, mille alusel on koostatud joonis 4 graafikud, on toodud lisas. Joonisel 5 on näide meloksikaami retentsiooniaegade muutumisest erinevatel metanooli kontsentratsioonidel.



Joonis 4 Analüütide retentsiooni sõltuvus metanooli sisaldusest eluendis.

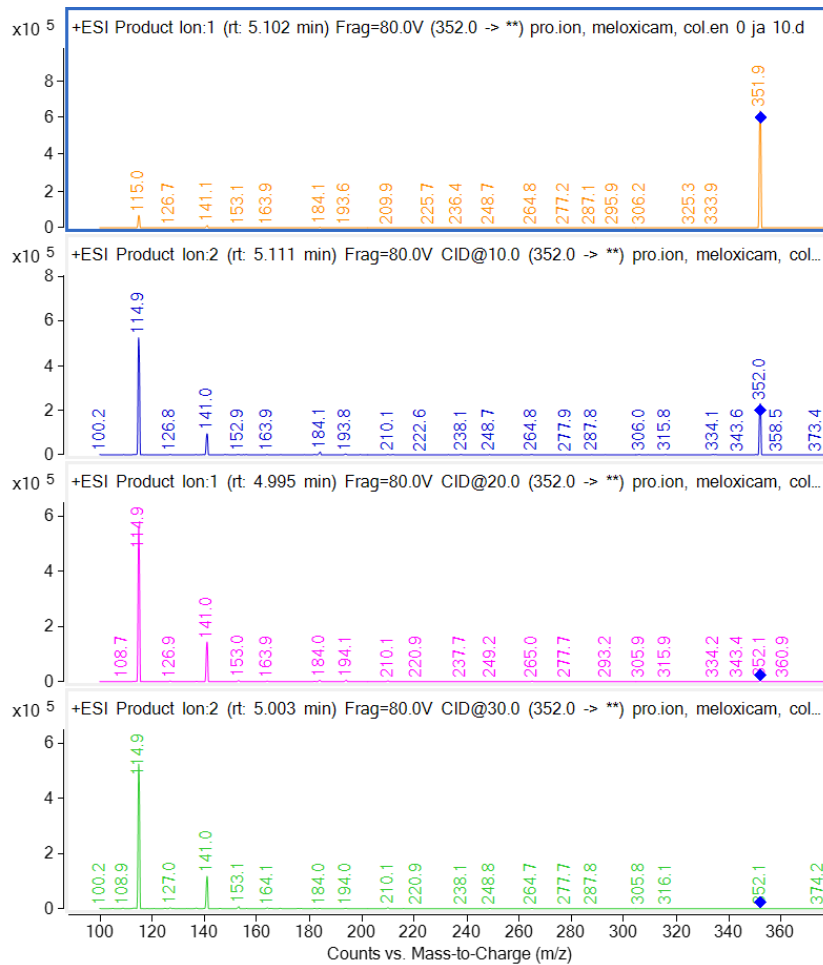


Joonis 5 Näide eluendi koostise mõjust meloksikaami retentsioonile (ülestatud kromatogramm).

Isokraatilise meetodi eeliseks on selle lihtsus ja kiirus, kuid rahuldavat analüütide lahutust ei saavutatud isegi madalate metanooli sisalduste juures, mistõttu isokraatilise meetodi kasutamisest loobuti ja tuli kasutada gradienti, mis on toodud joonisel 3.

4.2. Massispektromeetria parameetrid

Meetodi arendusel tegeleti ka fragmenteerimise pörkeenergiate optimeerimisega. Kasutati produktiooni skaneerimise režiimi, mille eesmärk oli leida massispektrist eellasioonile vastavad produktioonid. Pörkeenergia väljendab MS pörkerakusioonile antavat kineetilist energiat. Vastavalt sellele pörkab ioon pörkerakus lämmastiku molekulidega kõrgema või madalama energiaga. Tulemuseks on vastavalt ulatuslikum või vähemulatuslik iooni fragmenteerumine. Pörkeenergiat muudetakse pörkeraku pinge muutmise teel. Ühelaenguliste ionide korral on pörkeraku pinge (voltides) numbriliselt võrdne pörkeenergiaga (elektronvoltides). Pörkeenergiat muudetakse selleks, et analüütide identifitseerimise usaldusväärsust tõsta.²¹ Parameetrit muudeti kümne ühiku kaupa nullist kolmekümneni. Jooniselt 6 on näha, et meloksikaami puhul saadi kõige intensiivsemad produktioonid piigid, kui pörkeenergia väärtus oli 20 eV.



Joonis 6 Näide pörkeenergia optimeerimisest meloksikaami korral.

Iga analüüdi puhul tuleb olla kindel, et tegu on õige aine piigiga. Sellele annavad kinnitust analüüsi käigus leitud retentsiooniaeg, analüüdi molaarmass ja kindla massi ja laengu suhtega (m/z) kvantiseerimisioon, ometi ei ole see piisav. Tõestuseks on vaja kinnitavat iooni, mis näitab, et vaadeldav eellasioon fragmenteerub ka mõnel teisel viisil (teine üleminek) ja retentsiooniaeg on sama. Näiteks atsetaminofeeni eellasioon on m/z 152 ja tema kvantiseerimisioon on m/z 110, mille retentsiooniaeg on 5,2 minutit. Kui kinnitava iooni, mille m/z on 65, retentsiooniaeg langeb kokku kvantiseerimisiooni retentsiooniajaga, siis see lisab kindlust, et tegu on otsitava ainega. Lisaks kvantiseerimis- ja kinnitusülemineku olemasolule peab nende intensiivsuste suhe proovis olema sama, mis kalibreerimislahuses.²²

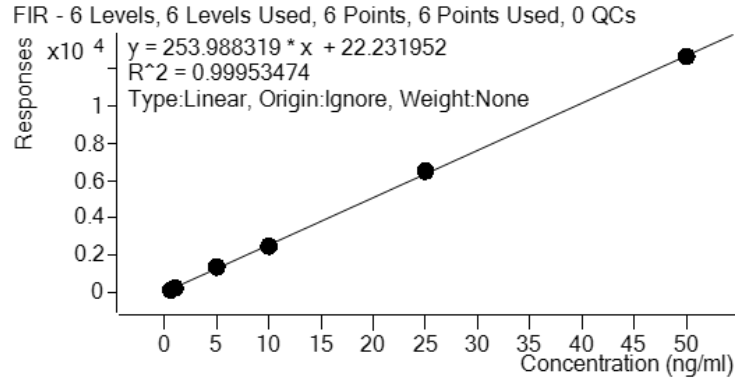
Töö käigus kasutati erinevaid massispektrometri töörežiime, kuid mõõtmised viidi läbi kasutades dünaamilist MRM-i. Dünaamilise MRM-i eelis traditsioonilise MRM-i ees on see, et ajaakende loomine ja muutmine on oluliselt lihtsam. Ajaaken on ajavahemik, mille jooksul otsitav analüüt peaks elueeruma. St analüüdile vastavat signaali registreeritakse ainult ajavahemikus, mil see eeldatavasti elueerub vedelikkromatograafist. Sellega hoitakse kokku instrumendi registreerimistsükli aega.²³ Joonisel 7 on toodud analüütide kolonnist väljumise ajaaknad.



Joonis 7 Käesolevas töös kasutatud analüütide registreerimise ajaaknad.

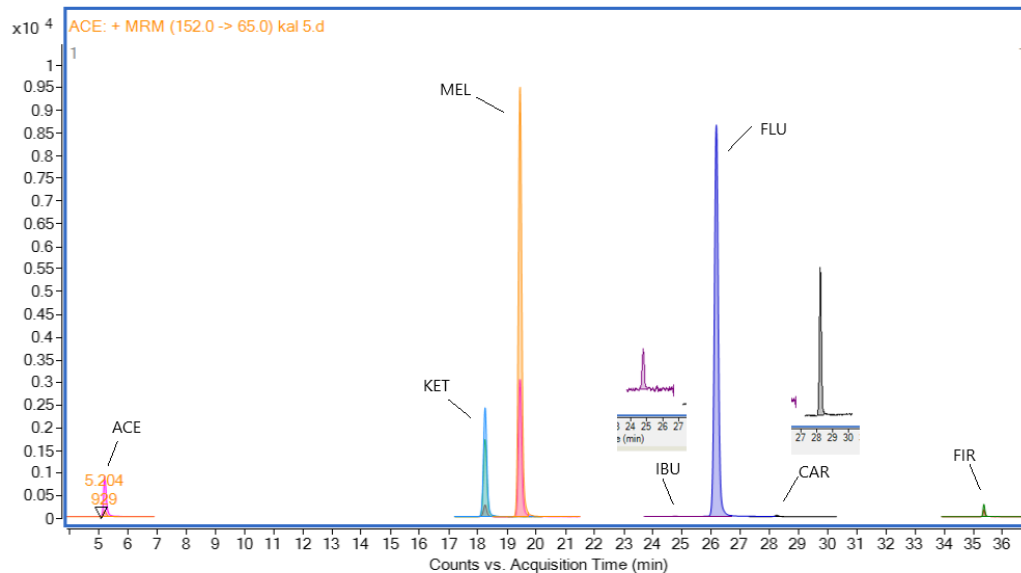
4.3. Kalibreerimine

Kõik uuritud ühendid andsid kalibreerimisgraafikutel väga hea lineaarse sõltuvuse, näiteks joonisel 8 on kujutatud firokoksiibi kalibreerimisgraafik. Kõikide analüütide korrelatsioonikordajate ruudud olid üle 0,995.



Joonis 8 Firokosiibi kalibreerimisgraafik.

Joonisel 9 on toodud kõige madalama kontsentratsiooniga kalibreerimislahuse ($c = 5 \mu\text{g/l}$) kromatogramm, kus on näha, et kõikide analüütide piigid on lahus. Kõige madalama kontsentratsiooniga kalibreerimislahuse puhul ületasid kõigi analüütide korral signaal-müra suhted kümnet kõigi analüütide korral välja arvatud ibuprofeeni. Ibuprofeeni jaoks võib määramispiiri esialgselt hinnata $5 \mu\text{g/l}$ (sisestatavas lahuses).



Joonis 9 Madalaima kontsentratsioonitaseme ($c = 5 \mu\text{g/l}$) kalibreerimislahuse kromatogramm.

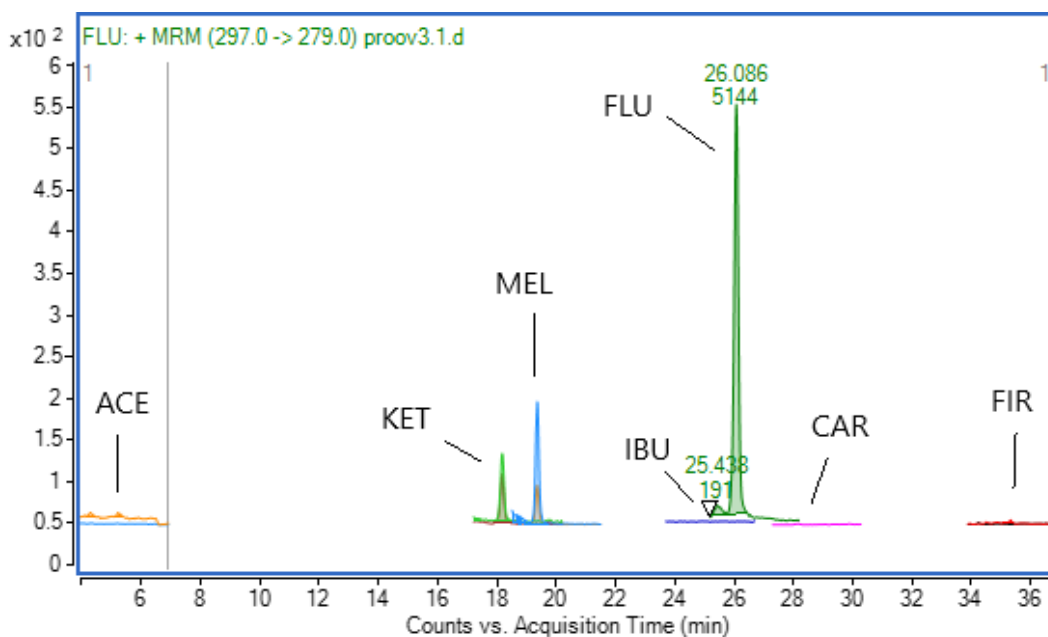
4.4. Proovi ettevalmistus

Lisamiskatsed tehti kanamaksa matriksile vastavalt punktis 3.4 kirjeldatud meetodikale.

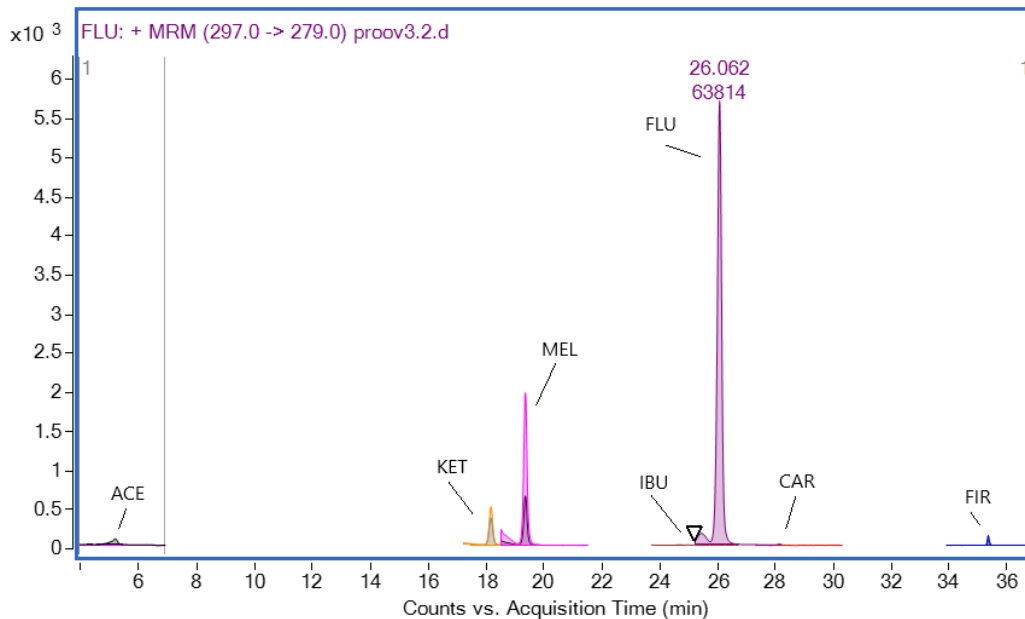
Stabiilselt madalamaid saagiseid, st alla 60% andsid karboksüülrühmadega ühendid nagu ketoprofeen, karprofeen, ibuprofeen, mille saagised tulid keskmiselt vastavalt 57%, 56% ja 53%. Erandiks oli fluniksiin, mille saagis oli 78%. Edaspidi tuleks saagiste parandamiseks tegeleda pH optimeerimisega. Kõrgemaid saagiseid kui 60% andsid meloksikaam, firokosiib ja atsetaminofeen, mille saagised olid keskmiselt vastavalt 67%, 72% ja 64%.

Joonisel 10 on näha rikastamata proovi lahuse kromatogramm. Atsetaminofeenil, karprofeenil, firokosiibil ja ibuprofeenil rikastamata proovis piike ei esine. Ketoprofeenil ja meloksikaamil on piigid nähtavad ning rikastamata proovis on signaalid üle tühiproovi taseme, kuid alla kalibreerimistaseme. Fluniksiinile vastab intensiivne piik. Joonisel 11 on kujutatud rikastatud proovi lahuse kromatogramm. Kõik ühendid on korralikult lahutatud, retentsiooniajad vastavad analüütide retentsiooniaegadele kalibreerimislahustes ja detekteeriti nii kvantiseerimis- kui kinnitavad ioonid. Fluniksiin annab intensiivsema piigi, kui teised ühendid.

Euroopa Ravimiameti (EMA) bioanalüütiliste meetodite valideerimisjuhistes on esitatud LC-MS analüüsimeetodite jaoks nõue, et analüüdi signaal tühiproovis ei tohi olla suurem kui 20% määramispiirist.²⁴ Töö praeguses faasis käsitletakse määramispiirina kalibreerimisgraafiku madalaima kontsentratsiooniga punkti.



Joonis 10 Rikastamata proovi ekstrakti kromatogramm.



Joonis 11 Rikastatud proovi ekstrakti kromatogramm.

Joonistelt 12 kuni 18 on näha iga analüüdi retentsiooniajad ja eellasiooni üleminekud kvantiseerimisioonile. Meloksikaami, ketoprofeeni, firokosiibi ja atsetaminofeeni puhul on näha ka üleminekut kinnitavale ioonile. Joonistel on kujutatud kattuvalt rikastatud kui ka rikastamata proovide piigid. Kvantiseerimisüleminekule ja kinnitavale üleminekule vastavad piigid on sarnase retentsiooniaja ja piigi kujuga.

Tabelis 4 on toodud käesolevas töös saadud analüütide retentsiooniajad. Kromatograafilise jooksu aeg oli 50 minutit ja analüüdid elueerusid 36 minuti jooksul.

Tabel 4 Analüütide retentsiooniajad ja jälgitavad üleminekud.

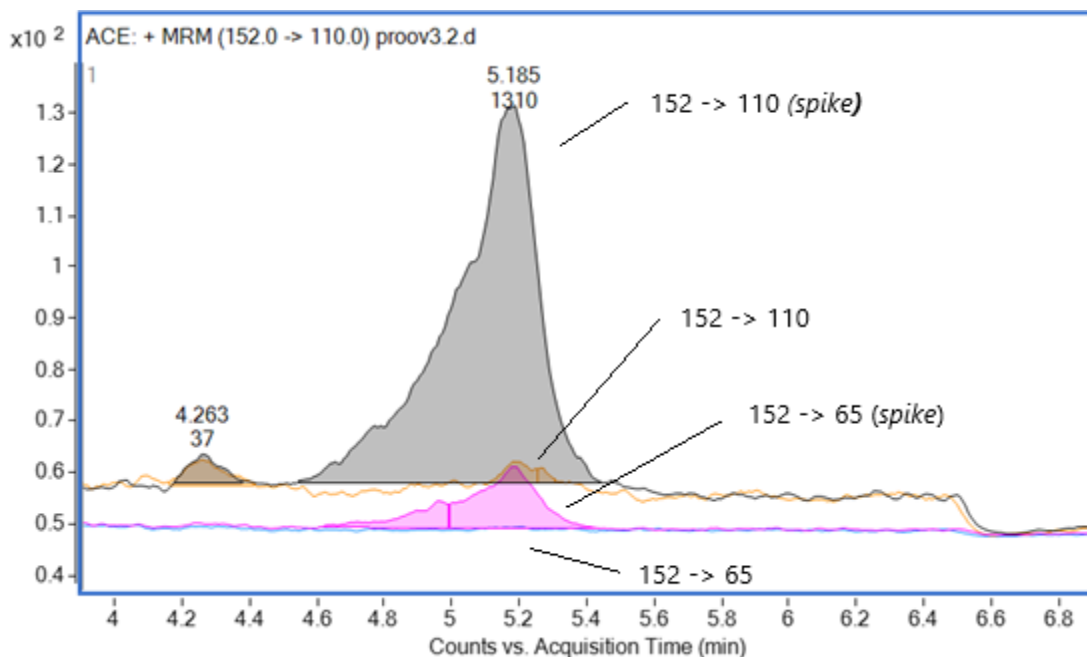
Analüüdi nimetus	Eellasioon	Produktioon	Retentsiooniaeg (min)	Põrkeenergia
Atsetaminofeen	152	110	5,18	20
Atsetaminofeen	152	65	5,18	20
Ketoprofeen	255	209	18,16	10
Ketoprofeen	255	105	18,16	10
Ibuprofeen	207	161	24,7	0

Analüüdi nimetus	Eellasioon	Produktioon	Retentsiooniaeg (min)	Põrkeenergia
Meloksikaam	352	141	19,35	20
Meloksikaam	352	115	19,35	20
Firokoksiib	337	283	35,34	10
Firokoksiib	337	237	35,34	10
Fluniksiin	297	279	26,06	20
Karprofeen	272	228	28,12	10

SANTE validerimisjuhendis²² on esitatud kriteeriumid jääkide määramise analüüsimeetoditele. On sätestatud, et jooksudevahelised piikide retentsiooniaegade nihked ei tohi olla suuremad kui $\pm 0,1$ minutit. Kõikide analüütide puhul saadud retentsiooniajad jäid sellesse vahemikku.

Atsetaminofeeni (joonis 12) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes oli 5,20 min ja proovides 5,18 min. Erinevus on küll väga väike, kuid paistab olema süstemaatiline. Põhjuseks võib olla asjaolu, et proovilahused sisaldavad rohkem atsetonitriili kui kalibreerimislahused. Kõrgem atsetonitriili sisaldus võibki põhjustada atsetaminofeeni kiirema elueerumise proovilahuste korral. Probleemi kõrvaldamiseks tuleks kõigi lahuste puhul kasutada sama solventi.

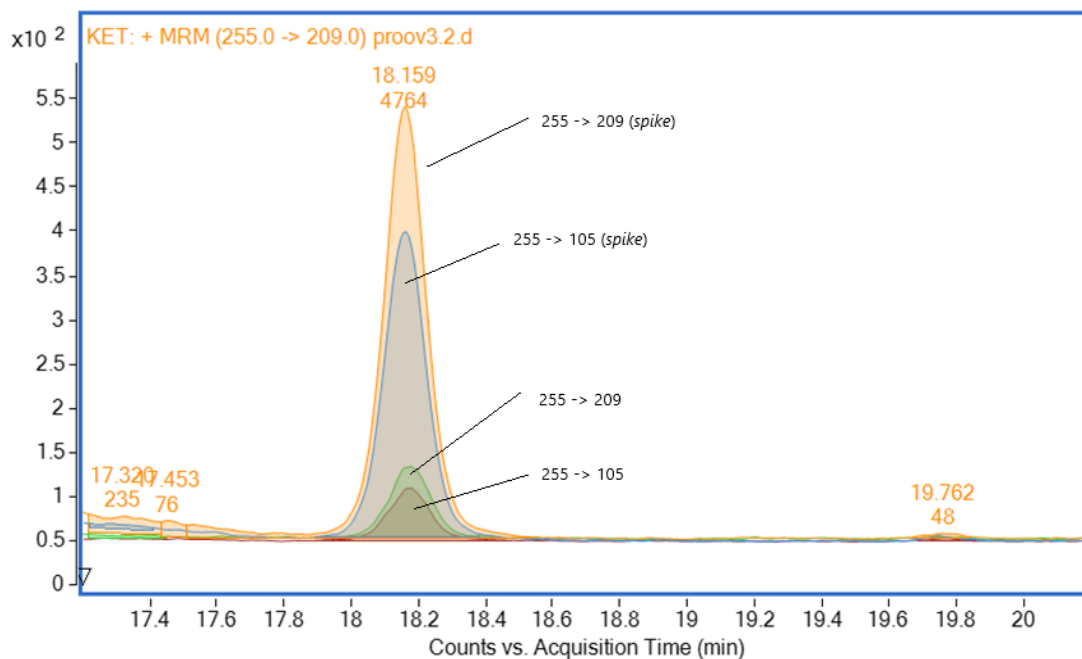
Tühisüstid enne ja pärast kalibreerimislahuseid ning pärast proovilahuseid ei andnud atsetaminofeeni piike. Seega analüüdi ülekannet (*carryover*) ei ole. Rikastamata prooviekstraktide korral on piigid müra tasemel. Saagisiseks saadi 64%.



Joonis 12 Atsetaminofeenile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogrammid (ülesticku asetatud).

Ketoprofeeni (joonis 13) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes oli 18,24 min ja proovides 18,17 min. Erinevus on väike, kuid paistab silma retentsiooniaja süstemaatiline vähenemine. Edasises metoodika arenduses tuleb tähelepanu pöörata eluendi koostise, temperatuuri stabiilsusele ja tasakaalustumisele.

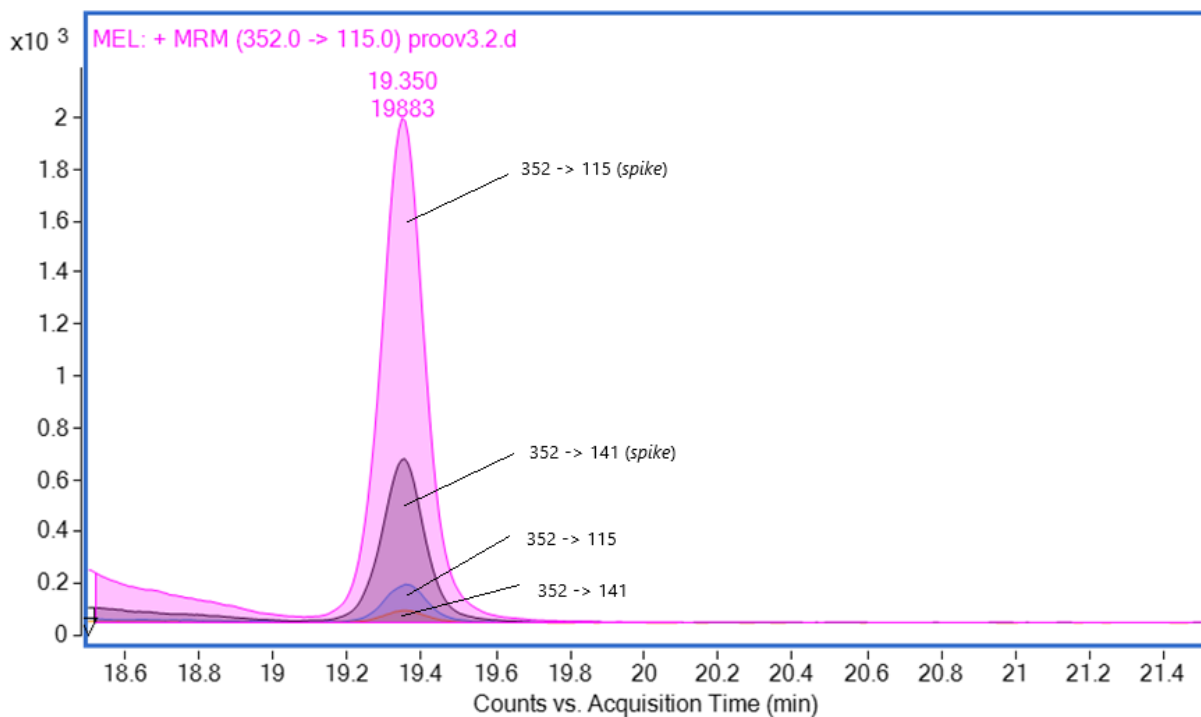
Tühisüst enne kalibreerimislahuseid ketoprofeeni piiki ei anna, kuid kõrgeima kontsentratsiooniga kalibreerimislahusele järgnevas tühisüstis on märgata ketoprofeeni signaali tõusu. See viitab analüüdi ülekandele (*carryover*), mille vältimiseks tuleb edaspidi programmeerida proovide automaatsisestaja nõela pesuprogramm. Rikastamata prooviekstraktide korral on piigid üle müra taseme. Saagis oli 57%.



Joonis 13 Ketoprofeenile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogramm (ülesticku asetatud).

Meloksikaami (joonis 14) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes oli 19,44 min ja proovides 19,36 min. Väga väike süstemaatiline vähenemine on tingitud põhjustest, mis on kirjeldatud juba eelmiste ühendite korral. Edasises metoodika arenduses tuleb tähelepanu pöörata eluendi koostise, temperatuuri stabiilsusele ja tasakaalustumisele.

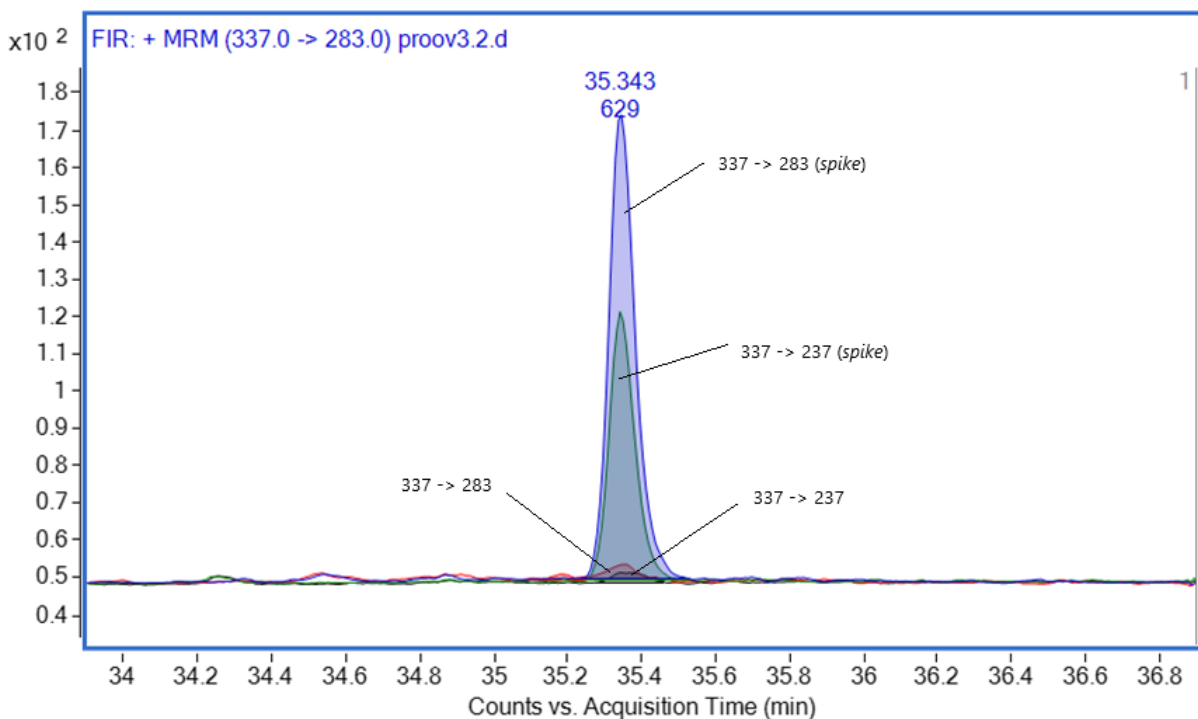
Rikastamata prooviekstraktide korral on piigide signaalid üle müra taseme, kuid tunduvalt madalamad kui madalaim kalibreerimispunkt. See võib viidata sellele, et algne maks sisaldab meloksikaami või on tegemist segajatega. Saagiseks saadi 67%.



Joonis 14 Meloksikaamile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogrammid (ülesticku asetatud).

Firokksiibi (joonis 15) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes kui ka proovides oli 35,36 min.

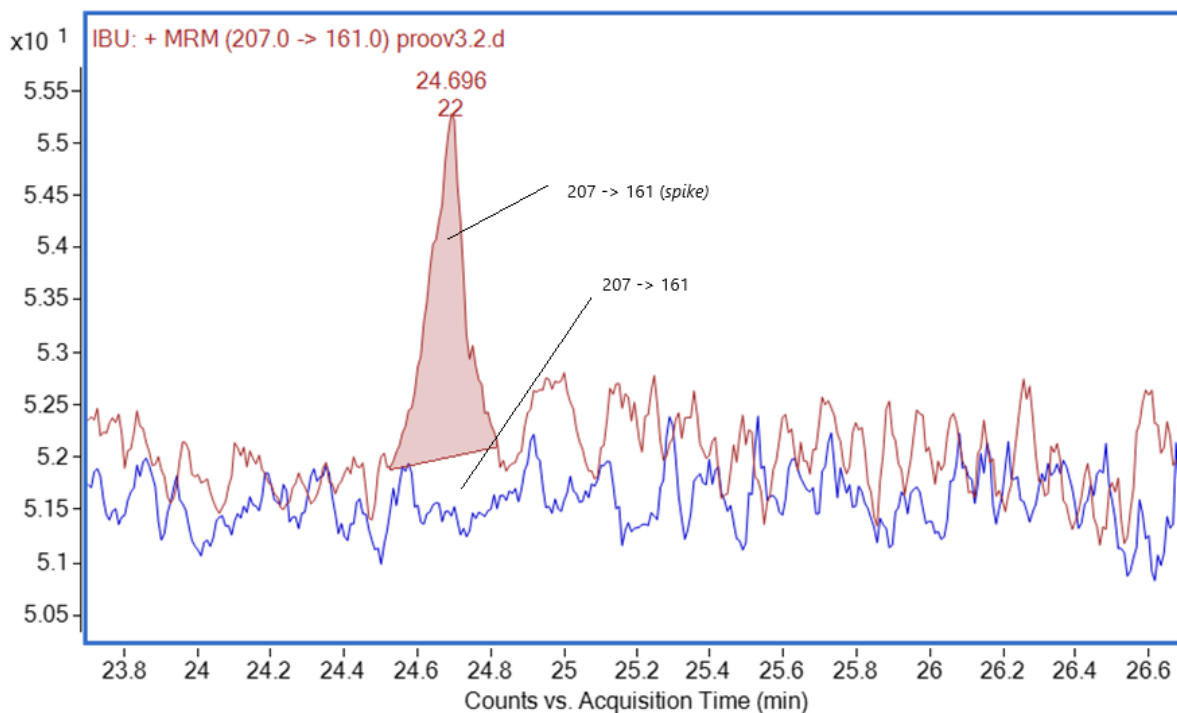
Tühisüstid enne ja pärast kalibreerimislahuseid ning pärast proovilahuseid ei andnud firokksiibi piike, seega analüüdi ülekannet ei ole. Proovide signaalid ja saagised olid stabiilsed. Saagiseks saadi 72%. Samas olid rikastamata proovides signaalid kõrged, mis võib viidata sellele, et firokksiibi leidis algse maksaproovis.



Joonis 15 Firokosiibile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogrammid (ülesticku asetatud).

Ibuprofeeni (joonis 16) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes kui ka proovides oli 24,78 min.

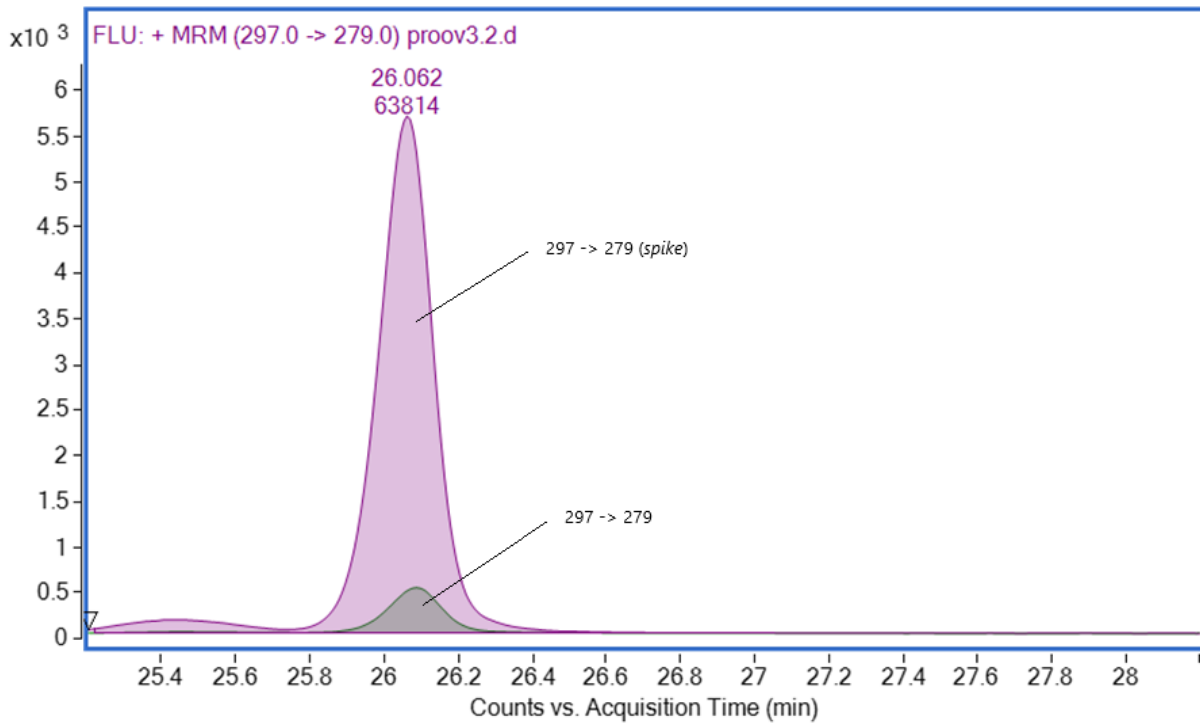
Tühisüstid enne ja pärast kalibreerimislahuseid ning pärast proovilahuseid ei andnud ibuprofeeni piike, seega analüüdi ülekannet ei ole. Proovide signaalid olid väga madalad. Saagiseks saadi 53%, mis oli võrreldes teiste uuritud ühenditega kõige madalam.



Joonis 16 Ibuprofeenile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogrammid (ülesticku asetatud).

Fluniksiini (joonis 17) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes oli 26,18 min ja proovides 26,07 min. Erinevus on väike, kuid paistab silma retentsiooniaja süstemaatiline vähenemine. Edasises metoodika arenduses tuleb tähelepanu pöörata eluendi koostise, temperatuuri stabiilsusele ja tasakaalustumisele.

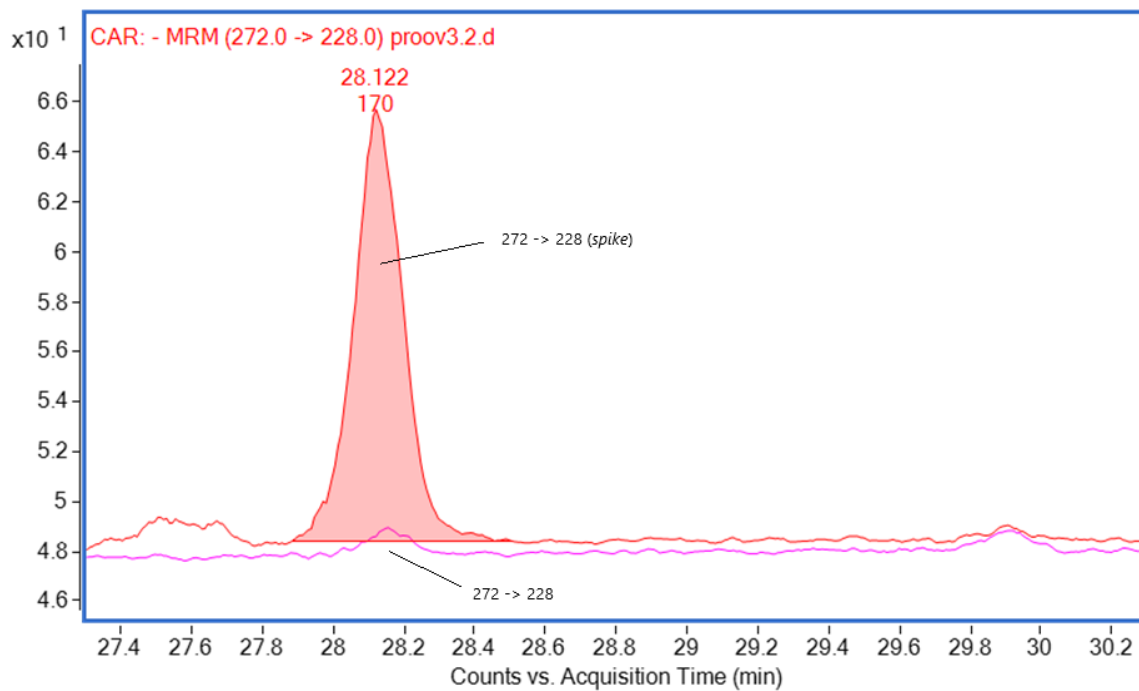
Tühisüst enne kalibreerimislahuseid fluniksiini piiki ei anna, kuid kõrgeima kontsentratsiooniga kalibreerimislahusele järgnevas tühisüstis on märgata fluniksiini signaali tõusu. See viitab analüüdi ülekandele. Rikastamata ja rikastatud nähti intensiivseid signaale, kuid nende retentsiooniajad ei klappinud fluniksiini kalibreerimislahuste retentsiooniaegadega. Tõenäoliselt oli tegu segajaga proovi maatriksist. Saagis oli 78%.



Joonis 17 Fluniksiinile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogrammid (ülesticku asetatud).

Karprofeeni (joonis 18) retentsiooniaeg kalibreerimislahustes oli 28,21 min, kus kontsentratsiooni suurenedes retentsiooniajad vähenevad. Retentsiooniaeg proovides oli 28,15 min ja need vähenevad reas. Edasises metoodika arenduses tuleb tähelepanu pöörata kolonni tasakaalustumisele.

Tühisüst enne ja pärast kalibreerimislahuseid fluniksiin piiki ei anna. Rikastamata proovides olid nähtavad signaalid, mis olid tõenäoliselt tingitud segajast proovi maatriksis. Proovide signaalid olid suhteliselt madalad. Saagis oli 56%.



Joonis 18 Karprofeenile vastavad rikastatud ja rikastamata kanamaksa proovide ekstraktide kromatogramm (ülesticku asetatud).

5. Kokkuvõte

Töö käigus arendati välja esmane meetod põletikuvastaste ravimite analüüsiks loomses maatriksis kasutades vedelikkromatograafia-massispektromeetria meetodit. Prooviekstrakti komponentide lahutamiseks kasutati pöördfaaskromatograafiat ja heksafluoroisopropanooli (HFIP) baasil puhverlahust.

Uuritavateks ühenditeks olid atsetaminofeen, ibuprofeen, ketoprofeen, fluniksiin, firokosiib, meloksikaam ja karprofeen. Meetodi arendusel optimeeriti eluendi koostist, muutes HFIP puhverlahuse ja metanooli vahekorda. Kõrgema detekteerimise tundlikkuse saavutamiseks optimeeriti analüütide põrkeenergiad. Valitud tingimustes oli võimalik kõik ühendid kromatograafiliselt lahutada ja detekteerida kontsentratsioonidel $\leq 5 \mu\text{g/l}$.

Teostati kalibreerimised nende analüütidega kuuel erineval kontsentratsioonil. Tehti lisamiskatsed maksamaatriksitele. Proovi ettevalmistuse alusmeetod oli modifitseeritud QuEChERS. Analüütide saagised jäid rikastuskontsentratsiooni $50 \mu\text{g/kg}$ juures vahemikku 53-78%.

Töö raames saavutati uuritud seitsme analüüdi jaoks optimaalsed kromatograafilised lahutuse tingimused. Eellasiooni üleminekud produktsioonideks osutusid sobilikuks, kuid kolmele analüüdile tuleks leida veel kinnitavad ioonid. Proovi ettevalmistus on üldiselt sobiv, kuid edaspidi tuleks veel tegeleda pH optimeerimisega, et kõikide analüütide saagised oleksid suuremad kui 60%. Kui on saavutatud aktsepteeritavad suutlikkusnäitajad, tuleks meetod lõplikult valideerida, misjärel oleks see kasutatav loomsetes proovides põletikuvastaste ravimijääkide analüüsiks.

6. Summary

A primary liquid chromatographic-massspectrometric method was developed for the analysis of anti-inflammatory drugs in the samples of animal origin. Reverse phase chromatography and hexafluoroisopropanol buffer were used for separation of analytes acetaminophen, ibuprofen, ketoprofen, flunixin, firocoxib, meloxicam and carprofen.

During the development of the method, the composition of the eluent was optimized by varying the concentration of hexafluoroisopropanol and methanol. Collision energy of the analytes was optimized to achieve better selectivity. Selected conditions were suitable for the separation of all the analytes at the concentration of $\leq 5 \mu\text{g/l}$.

Calibrations were performed with analytes at six different concentrations. Spiking experiments were carried out using liver matrix. For sample preparation a modified QuEChERS was used. Recoveries of analytes at spiking level $50 \mu\text{g/kg}$ ranged from 53-78%.

Optimal chromatographic separation conditions were obtained for the seven analytes studied. Transissions of the precursor to the product ions proved to be suitable, but qualifier ions should still be found for the three analytes. Sample preparation method is generally suitable, but further optimization of the pH should be performed so that recoveries of all analytes are greater than 60%. Once acceptable performance is achieved, the method should be finally validated and can be used for control of anti-inflammatory residues in samples of animal origin.

7. Kasutatud kirjandus

- (1) Ghlichloo, I.; Gerriets, V. *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)*. National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>.
- (2) Cuthbert, R.; Parry-Jones, J.; Green, R. E.; Pain, D. J. NSAIDs and Scavenging Birds: Potential Impacts beyond Asia's Critically Endangered Vultures. *Biol. Lett.* **2007**, *3* (1), 90–93. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0554>.
- (3) Hu, T.; Peng, T.; Li, X.-J.; Chen, D.-D.; Dai, H.-H.; Deng, X.-J.; Yue, Z.-F.; Wang, G.-M.; Shen, J.-Z.; Xia, X.; Ding, S.-Y.; Zhou, Y.-N.; Zhu, A.-L.; Jiang, H.-Y. Simultaneous Determination of Thirty Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Residues in Swine Muscle by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1219*, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.009>.
- (4) Jedziniak, P.; Olejnik, M.; Pietruk, K.; Protasiuk, E.; Szprengier-Juszkiewicz, T.; Żmudzki, J. Simultaneous Determination of Residues of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Glucocorticosteroids in Animal Muscle by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2016**, *9* (6), 1837–1848. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0352-y>.
- (5) Mainero Rocca, L.; Gentili, A.; Pérez-Fernández, V.; Tomai, P. Veterinary Drugs Residues: A Review of the Latest Analytical Research on Sample Preparation and LC-MS Based Methods. *Food Addit. Contam. Part A* **2017**, 1–19. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1298846>.
- (6) Quigley, A.; Cummins, W.; Connolly, D. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction in the Analysis of Milk and Dairy Products: A Review. *J. Chem.* **2016**, *2016*, 4040165. <https://doi.org/10.1155/2016/4040165>.
- (7) Ghambarian, M.; Tajabadi, F.; Yamini, Y.; Behbahani, M.; Sobhi, H. R.; Esrafil, A. An Efficient Sample Preparation Method Based on Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Associated with Back Extraction for Trace Determination of Acidic Pharmaceuticals. *Arab. J. Chem.* **2020**, *13* (1), 1924–1932. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.02.010>.
- (8) Chico, J.; Rúbies, A.; Centrich, F.; Companyó, R.; Prat, M. D.; Granados, M. Use of Gel Permeation Chromatography for Clean-up in the Analysis of Coccidiostats in Eggs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (14), 4777–4786. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6896-z>.
- (9) González-Curbelo, M. Á.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Evolution and Applications of the QuEChERS Method. *Green Extr. Tech.* **2015**, *71*, 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>.
- (10) Kang, J.; Park, S.-J.; Park, H.-C.; Gedi, V.; So, B.; Lee, K.-J. Multiresidue Determination of Ten Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Bovine, Porcine, and Chicken Liver Tissues by HPLC-MS/MS. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *174* (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1054-4>.
- (11) Dubreil-Chéneau, E.; Pirotais, Y.; Bessiral, M.; Roudaut, B.; Verdon, E. Development and Validation of a Confirmatory Method for the Determination of 12 Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Milk Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (37), 6292–6301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.006>.
- (12) Pugajeva, I.; Ikkere, L. E.; Judjallo, E.; Bartkevics, V. Determination of Residues and Metabolites of More than 140 Pharmacologically Active Substances in Meat by Liquid

- Chromatography Coupled to High Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *166*, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.024>.
- (13) Hamamoto, K.; Iwastuki, K.; Akama, R.; Koike, R. Rapid Multi-residue Determination of Pesticides in Livestock Muscle and Liver Tissue via Modified QuEChERS Sample Preparation and LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* **2017**, *34* (7), 1162–1171.
- (14) Kipper, K.; Herodes, K.; Leito, I. Fluoroalcohols as Novel Buffer Components for Basic Buffer Solutions for Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Retention Mechanisms. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (45), 8175–8180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.025>.
- (15) Kipper, K.; Herodes, K.; Leito, I.; Nei, L. Two Fluoroalcohols as Components of Basic Buffers for Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometric Determination of Antibiotic Residues. *The Analyst* **2011**, *136*, 4587–4594. <https://doi.org/10.1039/c1an15123a>.
- (16) Veigure, R.; Lossmann, K.; Hecht, M.; Parman, E.; Born, R.; Leito, I.; Herodes, K.; Kipper, K. Retention of Acidic and Basic Analytes in Reversed Phase Column Using Fluorinated and Novel Eluent Additives for Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1613*, 460667. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460667>.
- (17) Veigure, R.; Aro, R.; Metsvaht, T.; Standing, J. F.; Lutsar, I.; Herodes, K.; Kipper, K. A Highly Sensitive Method for the Simultaneous UHPLC–MS/MS Analysis of Clonidine, Morphine, Midazolam and Their Metabolites in Blood Plasma Using HFIP as the Eluent Additive. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1052*, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.007>.
- (18) Aurelien Desmarchelier; Bessaire, T.; Savoy, M.-C.; Tarres, A.; Mujahid, C.; Beck, A.; Mottier, P.; Delatour, T. Screening of 154 Veterinary Drug Residues in Foods of Animal Origin Using LC–MS/MS: First Action 2020.04. *J. AOAC Int.* **2020**, *104* (3), 650–681. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa168>.
- (19) *Komisjoni määrus (EL) nr 37/2010*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010R0037&from=EN>.
- (20) Dolan, J. *How Much Retention Time Variation Is Normal?*. LCGC North America-08-01-2014, Volume 32, Issue 8. <https://www.chromatographyonline.com/view/how-much-retention-time-variation-normal-0>.
- (21) Révész, Á.; Hevér, H.; Steckel, A.; Schlosser, G.; Szabó, D.; Vékey, K.; Drahos, L. Collision Energies: Optimization Strategies for Bottom-up Proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2021**, *n/a* (n/a), e21763. <https://doi.org/10.1002/mas.21763>.
- (22) *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021*. Document N° SANTE/11312/2021. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf.
- (23) Stone, P.; Glauner, T.; Kuhlmann, F.; Schlabach, T.; Miller, K. *New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses*. Agilent Technologies, Inc. 2009. https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-3595en_lo%20CMS.pdf.
- (24) *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.

8. Lisa - Analüütide retentsiooni sõltuvus metanooli sisaldusest eluendis.

analüüt	MeOH sisaldus %	k	log(k)
ACE	90	0.4862	-0.3132
	80	0.4570	-0.3401
	70	0.4592	-0.3380
	60	0.4954	-0.3050
	50	0.5306	-0.2752
	40	0.5392	-0.2682
	30	0.8667	-0.0621
	20	1.3325	0.1247
IBU	10	2.2057	0.3435
	90	1.0120	0.0052
	80	0.3550	-0.4497
	70	0.4124	-0.3847
	60	0.9409	-0.0265
	50	2.4631	0.3915
	40	2.3211	0.3657
	30	8.0336	0.9049
KET	20	24.2113	1.3840
	10	10.4808	1.0204
	90	0.0269	-1.5709
	80	0.1492	-0.8263
	70	0.3646	-0.4381
	60	0.4707	-0.3272
	50	0.8363	-0.0776
	40	0.7572	-0.1208
CAR	30	2.5294	0.4030
	20	8.9208	0.9504
	10	35.0915	1.5452
	90	0.2281	-0.6419
	80	0.3727	-0.4286
	70	0.4487	-0.3481
	60	1.1675	0.0672
	50	3.3553	0.5257
FLU	40	3.4550	0.5384
	30	14.6423	1.1656
	20	5.3361	0.7272
	10	14.6708	1.1665
	90	0.1763	-0.7538
	80	0.3013	-0.5210
	70	0.4418	-0.3548
	60	0.9324	-0.0304
FIR	50	2.7159	0.4339
	40	2.7569	0.4404
	30	10.5158	1.0218
	20	34.4254	1.5369
	10	44.8711	1.6520
	90	0.5330	-0.2733
	80	0.6543	-0.1842
	70	1.0408	0.0174
MEL	60	1.8184	0.2597
	50	4.0159	0.6038
	40	11.9967	1.0791
	30	12.7635	1.1060
	20	33.0117	1.5187
	10	25.9361	1.4139
	90	0.0016	-2.8067
	80	0.0914	-1.0393
	70	0.2634	-0.5794
	60	0.4246	-0.3720
	50	0.6481	-0.1883
	40	0.6782	-0.1687
	30	2.4922	0.3966
	20	11.6110	1.0649
	10	10.4545	1.0193

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Johanna Reinik,
(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose LC-MS analüüsimetoodika arendamine põletikuvastaste ainete määramiseks loomsetes maatriksites,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendajad on Koit Herodes ja Madis Leivits,
(*juhendajate nimed*)

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Johanna Reinik
26.05.2022