



Maria Lund

QuEChERS- näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen lääkeaineiden monijäämäseulonnalle maidosta

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

18.5.2021

Tiivistelmä

Tekijä: Maria Lund
Otsikko: QuEChERS-näytteenkäsittelymenetelmän kehittäminen
lääkeaineiden monijäämäseulonnalle maidosta
Sivumäärä: 34 sivua
Aika: 18.5.2021

Tutkinto: Laboratorioanalytiikka (AMK)
Tutkinto-ohjelma: Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat: erikoistutkija Marjo Mauriala
lehtori Mia Ruismäki

Ruokavirastossa tutkitaan lääkeainejäämiä eläinperäisistä elintarvikkeista viranomaisvalvontaan kuuluvassa vierasainevalvontaohjelmassa. Jäämien seulontaan käytettävät menetelmät ovat joko LC-MS/MS-, GC-MS/MS- tai ELISA-tekniikkaan perustuvia. Kyseisillä menetelmillä voidaan yleensä analysoida yhtä lääkeaineryhmää, eli n. 5–20 lääkeainetta kerrallaan. Tavoitteena oli kehittää laaja, yli 100 yhdistettä käsittävä LC-HRMS-tekniikkaan perustuva monijäämämenetelmä, jolla voidaan tehostaa laboratorion toimintaa seulonta-analytiikassa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää QuEChERS-näytteenkäsittelymenetelmä maitonäytteille seulonta-analyysiä varten. Näytteenkäsittelyn tulisi olla nopea ja yksinkertainen, mutta riittävä poistamaan matriisista analyysiä häiritseviä tekijöitä. Työssä kokeiltiin erilaisia QuEChERS- ja dSPE-menetelmiä, ja niiden yhdistelmiä. Lisäksi vertailtiin eri liuottimia ja suolojen ja liuotinmäärien vaikutusta.

Tulokseksi saatiin, että näytteitä ei kannata haihduttaa kuiviin konsentrointivaiheessa, sillä jotkut lääkeaineet haihtuvat, hajoavat tai eivät uudelleen liukene haihdutuksen jälkeen. Lisäksi havaittiin että hieman hapan liuotin antaa paremman saannon, kuin pelkkä asetonitrili.

Opinnäytetyön tulokset olivat erittäin hyödylliset Ruokavirastolle, sillä nämä ensimmäiset testit ovat mahdollistaneet sen, että menetelmä on nyt valmis ja rutiinikäytössä.

Avainsanat: QuEChERS, monijäämäseulonta maidosta, LC-HRMS-tekniikka

Abstract

Author: Maria Lund
Title: Development of a QuEChERS-Sample Preparation Method for Multiresidue Screening of Veterinary Drugs in Milk
Number of Pages: 34 pages
Date: 18th of May 2021

Degree: Bachelor of Laboratory Services

Degree Programme: Laboratory Sciences
Instructors: Marjo Mauriala, Senior Researcher
Mia Ruismäki, Senior Lecturer

The Finnish Food Authority is responsible for planning and carrying out the control of residues in foodstuffs of animal origin under the national residue control program. The laboratory analyses of the samples are carried out at the laboratory of the Finnish Food Authority. The methods used for the screening of veterinary drug residues are typically based on LC-MS/MS-, GC-MS/MS- and ELISA-techniques. The methods currently used in the laboratory can analyze only one group of drugs (5–20 drugs) simultaneously. The purpose of this study was to develop a broad screening method for over 100 drugs based on a LC-HRMS-technique. This new multiresidue screening method would enhance the performance of the laboratory significantly.

The goal of this thesis work was to develop a QuEChERS-sample preparation method for multiresidue screening of veterinary drugs in milk. The sample preparation should be fast and easy, but sufficient to remove the disruptive factors of the matrix. This thesis compares different QuEChERS- and dSPE-methods and combinations of these methods.

The result is that to avoid the evaporation of the samples to dryness, resulting lower yield due to possible destruction of some of the drugs, evaporation, breaking down or poor dissolution after the evaporation. The other important observation was, that acidic solvent gave better yield compared to pure acetonitrile.

The results of this thesis are very useful to the laboratory, because these first tests have enabled the new method to be taken for routine use.

Keywords: QuEChERS, Multiresidue screening, Veterinary drug, Milk

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Maidon lääkeainejäämien kemiallinen analytiikka	2
2.2	Maitonäytteen esikäsittely	2
2.3	QuEChERS-tekniikka ja dispersiivinen kiinteäfaasiuutto (dSPE)	3
2.4	LC-HRMS-tekniikka	5
3	Reagenssit ja laitteet	7
3.1	Reagenssit	7
3.2	Laitteet ja tarvikkeet	9
3.3	LC-HRMS-määritys	10
3.3.1	LC-olosuhteet	10
3.3.2	QTOF-parametrit	11
3.3.3	Kriteerit laitteen suorituskyvyille	12
4	Menetelmän kehitys	13
4.1	Saantokokeiden pitoisuustason määrittäminen	13
4.2	Uuttoliuottimen ja ulossuolauksen testaus	15
4.3	Uuttoliuottimien testaus	18
4.4	Haihtuvuustestaus	21
4.5	Uuttoliuottimien testaus laajennetulla yhdistemäärällä	23
4.6	Uuttoliuoksen määrän testaus laajennetulla yhdistemäärällä	29
5	Johtopäätökset	33
	Lähteet	34

Lyhenteet

ACN:	acetonitrile, suom. asetonitrili
BVL:	Bundesamt für Verbraucherchutz und Lebensmittelsicherheit suom. Saksan Ruokavirastoa vastaava laitos
dSPE:	dispersive solid phase extraction, suom. dispersiivinen kiinteäfaasiuutto
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay, suom. entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
GC:	gas chromatography, suom. kaasukromatografia
HRMS:	High Resolution Mass Spectroscopy suom. korkean erotuskyvyn massaspektrometria
LC:	Liquid Chromatography, suom. nestekromatografia
MRL:	Maximum Residual Limit, suom. jäämän enimmäispitoisuus
MS:	Mass Spectrometry, suom. massaspektrometria
QTOF:	Quadrupole Time of Flight, suom. kvadrupolilentoaika-analysaattori
QuEChERS-tekniikka	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rigid, Safe eli suom. nopea, helppo, halpa, tehokas, vakaa, turvallinen näytteenpuhdistusmenetelmä
rpm:	rounds per minute, suom. kierrosta minuutissa

1 Johdanto

Ruokaviraston kemian osastolla tutkitaan lääkeainejäämiä eläinperäisistä elintarvikkeista viranomaisvalvontaan kuuluvassa vierasainevalvonta-ohjelmassa. Jäämien seulontaan käytettävät menetelmät ovat joko LC-MS/MS-, GC-MS/MS- tai ELISA-tekniikkaan perustuvia. Kyseisillä menetelmillä voidaan yleensä analysoida yhtä lääkeaineryhmää, eli n. 5–20 lääkeainetta kerrallaan. Tavoitteena oli kehittää laaja, yli 100 yhdistettä käsittävä monijäämäseulontamenetelmä perustuen LC-HRMS-tekniikkaan, jolla voidaan tehostaa laboratorion toimintaa seulonta-analytiikassa.

Analyysiin käytettävä laite oli Agilentin 6545 Q-TOF LC/MS. Ruokaviraston erikoistutkija Marjo Mauriala toimi vastuuhenkilönä menetelmän kehityksessä Ruokaviraston kemianlaboratoriossa ja ohjasi opinnäytetyön yhdessä Metropolia AMK:n lehtori Mia Ruismäen kanssa. Marjo Mauriala oli ehtinyt aloittaa testaukset BVL:n ohjeen mukaan, mutta parista ensimmäisestä testistä ei ollut tullut tuloksia.

Näytteenkäsittelyn tulisi olla nopea ja yksinkertainen, mutta riittävä poistamaan matriisista analyysiä häiritseviä tekijöitä. Työssä kokeiltiin mm. QuEChERS- ja dSPE-menetelmiä ja näiden yhdistelmiä. Lisäksi vertailtiin eri liuottimia muuttamalla pH:ta (lisäämällä happoa tai emästä) ja kokeiltiin eri suolojen sekä eri liuotinmäärien vaikutusta.

2 Teoria

2.1 Maidon lääkeainejäämien kemiallinen analytiikka

Maito on peruselintarvike, ja muodostaa huomattavan osan varsinkin lasten ravinnosta. Maidon tulee olla paitsi terveellistä ja hygieenisesti korkealaatuista myös vapaata erilaisista jäämistä. Jäämät ovat aineita, joita ei esiinny maidossa silloin, kun lehmät on kasvatettu ja ruokittu hyvän maatalouskäytännön mukaisesti ”puhtaassa ympäristössä”. Erilaisia jäämiä joutuu maitoon lehmän ravinnon mukana, maidon käsittelyn yhteydessä tai eläimen lääkinnän seurauksena. Paitsi vieraita aineita sellaisenaan myös niiden maitoon erittyviä metaboliitteja pidetään jääminä. Maitoon kohdistuvan jäämävalvonnan tavoitteena on ensisijaisesti estää mikrobilääkkeitä sisältävän maidon joutuminen elintarvikkeeksi ja siten taata toksikologisesti hyvälaatuinen tuote. Eläinperäisten elintarvikkeiden, kuten maidon, jäämävalvonnan kemialliset analyysit hoidetaan Ruokaviraston kemian osastolla. Tutkittavien yhdisteiden uutto ja puhdistaminen näyttemateriaalista tehdään erilaisilla esikäsitelymenetelmillä ennen kromatografista tai immunologista analyysiä (1).

2.2 Maitonäytteen esikäsitely

Maitonäyte uutetaan liuoksella, johon tutkittavat yhdisteet liukenevat. Uuton saantoa testataan takaisinsaantokokeilla lisäämällä tutkittavaa standardiyhdistettä tunnettu määrä näyttematriisiin ennen uuttoa ja analysoimalla näyte ja vertaamalla analyysin tulosta lisättyyn määrään. Näyteuutosta käsitellään lisäksi QuEChERS-menetelmällä tai kiinteäfaasiuutolla. Näyteuutosta puhdistetaan siten, että kromatografisessa analyysissä ei ole jäljellä häiritseviä yhdisteitä. Koska tutkittavien yhdisteiden pitoisuudet ovat erittäin pieniä, näyteuutosta konsentroidaan haihduttamalla liotinta pois typpihaihduttimella. Ennen analyysiä näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen, ja nestekromatografisessa analyysissä käytetään tavallisesti ajoliuosta. Jäämäanalytiikassa tärkeintä on saavuttaa riittävä herkkyys yhdisteen pitoisuuden luotettavalle mittaamiselle (1).

2.3 QuEChERS-tekniikka ja dispersiivinen kiinteäfaasiuutto (dSPE)

QuEChERS-tekniikka on kehitetty lähinnä näytteen puhdistukseen pestisidien monijäämäanalyysiin 2000-luvun alussa. QuEChERS tulee sanoista Quick, Easy, Cheap, Effective, Rigid, Safe eli suomeksi, nopea, helppo, halpa, tehokas, vakaa ja turvallinen.

QuEChERS-tekniikka soveltuu myös bentsimidatsolien ja muiden loislääkkeiden määrittämiseen lihaksesta, maidosta ja kananmunasta. Enimmäispitoisuudet (MRL-pitoisuus) vaihtelevat lääkaineesta riippuen maidossa välillä 10–100 µg/kg (1).

QuEChERS-tekniikka on nimensä mukaan mm. helppo, nopea ja edullinen.

Kuvassa 1 on esitetty menetelmän eri vaiheet, jotka ovat seuraavat:

1. Näyte punnitaan.
2. Lisätään vettä sekä sisäinen standardi.
3. Lisätään asetonitriliä, johon polaariset lääkaineet liukenevat parhaiten. Joissakin tapauksissa pH:ta pitää säätää, ja asetonitriliin tulee lisätä hieman happoa tai emästä.
4. Ravistellaan vorteksilla, jotta näyte sekoittuu hyvin.
5. Lisätään suoloja, jotta faasit erottuvat paremmin. Tämä ulossuolausvaihe vaikuttaa analyyttien jakautumiseen eri faasien välillä. Tässä vaiheessa näyte kuumenee hetkellisesti.
6. Ravistellaan 1 min.
7. Sentrifugoidaan, jotta faasit erottuvat tarkasti ja suolat ja matriksi erottuvat supernatantista.
8. Näyte on jakautunut kahteen faasiin, yläfaasi on liuotinfraasi ja alafaasi on vesifaasi.

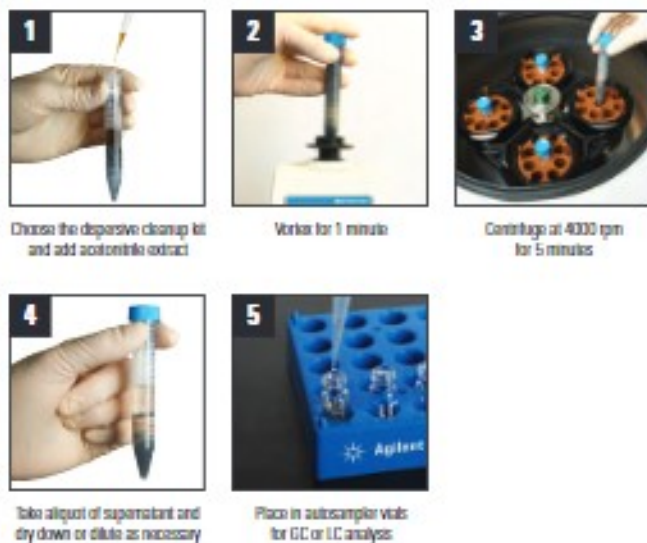


Kuva 1. QuEChERS-tekniikan vaiheet (8 vaihetta)(2).

Dispersiivinen kiinteäfaasiuutto tehdään usein QuEChERS-tekniikan jälkeen. On olemassa paljon erilaisia kaupallisia dSPE-kittejä, jotka soveltuvat erityyppisille lähtömateriaaleille. Kuvassa 2 on esitetty dispersiivisen kiinteäfaasiuuton eri vaiheet, jotka ovat seuraavat:

1. Valitaan sopiva dSPE- kitti ja lisätään siihen asetonitriliifaasia (QuEChERS-tekniikan vaiheesta 8). Rasvaiselle maidolle suositeltiin C18- dSPE kittiä.
2. Ravistellaan vorteksilla 1 min, jotta näyte ja kiinteäfaasi sekoittuvat hyvin ja näytteestä sitoutuu analyysiä haittaavat aineet kiinteäfaasi-rakeisiin.
3. Sentrifugoidaan 4000 rpm 5 min.
4. Otetaan supernatantti talteen ja haihdutetaan tai laimennetaan, jos on tarpeen.
5. Pipetoidaan GC- tai LC-putkiin, jotka ovat siten valmiita analysoitavaksi.

Step 2: Dispersive Solid Phase Extraction (dSPE)



Kuva 2. Dispersiivisen kiinteäfaasiuuton vaiheet (1-5).(2).

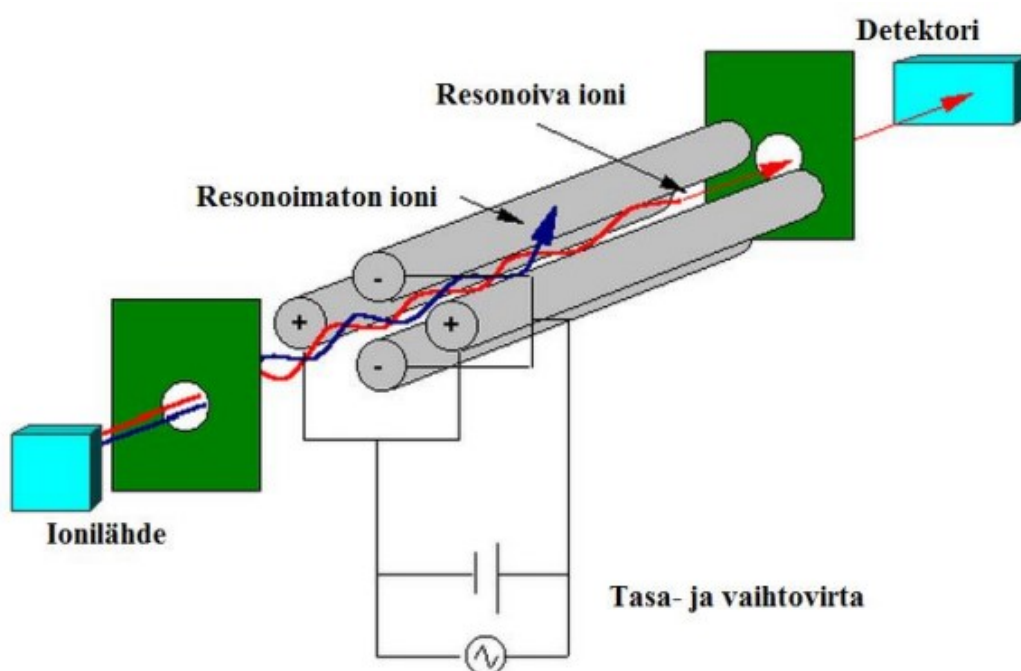
Kuvissa 1 ja 2 on esitetty QuEChERS- ja dSPE-menetelmät vaihe vaiheelta. Tässä opinnäytetyössä vertaillaan yllä esitettyjä puhdistusmenetelmiä ja niiden yhdistelmiä.

2.4 LC-HRMS-tekniikka

Nestekromatografia (liquid chromatography, LC) on fysikaalinen erotusmenetelmä, jossa yhdisteiden erottuminen perustuu niiden erilaisiin vuorovaikutuksiin liikkuvan nestefaasin ja kiinteäfaasin välillä. LC:llä voidaan periaatteessa analysoida mikä tahansa yhdiste, jos se on liuenneena johonkin liuottimeen. Nestekromatografiassa voidaan käyttää lukuisia erilaisia detektoreita, joista yleisimmät ovat UV, fluoresenssi, elektrokemialliset detektorit, valon sironta ja MS. Näistä menetelmistä erityisesti MS:ssä yhdistyvät erinomainen herkkyys ja spesifisyys (3).

Tässä opinnäytetyössä käytettiin Agilentin kvadrupoli lentoaikamassa-analysaattoria, QTOF (kuva 4). Toimintaperiaatteeltaan kvadrupolit ovat

suodattimia, jotka päästävät ioneja lävitseen niiden m/z -suhteen perusteella. Kvadrupoli koostuu neljästä yhdensuuntaisesta elektrodista, joiden väliin muodostetaan sähkökenttä. Ionien saapuessa elektrodien väliin ne joutuvat sähkökentän vaikutuksesta niiden kulkusuunnalle kohtisuoraan värähdysliikkeeseen. Jos ionien värähtely on liian laajaa, ne törmäävät elektronisauvoihin eivätkä pääse kvadrupolin läpi detektorille. Kun jännitteitä muutetaan, muuttuu myös kvadrupolin läpi pääsevien ionien m/z -suhde. Tällä tavoin voidaan pyyhkäistä läpi tietty m/z -alue ja siten mitata massaspektri (4).



Kuva 3. Kvadrupolin toimintaperiaate kaavakuvana (5).

Erimassaisten ionien nopeuseroihin perustuu lentoaikamassaspektrometria (TOF). Ionit saavat saman kineettisen energian, kun ne kiihdytetään vakiojännitteellä. Raskaat ionit lentävät kevyitä hitaammin. Samaan aikaan lähteneet erimassaiset ionit saapuvat eri aikaan detektorille, jolloin niiden massat saadaan selville. Lentoaikamassamenetelmä on nopea ja sillä saavutetaan suuri resoluutio (3).

3 Reagenssit ja laitteet

3.1 Reagenssit

Liuottimet ovat HPLC-laattaa ellei toisin mainita ja muut reagenssit ovat p.a. laatua.

Menetelmänkehityksessä käytettiin seuraavia reagensseja ja liuoksia:

- metanoli, Merck 1.06007.2500, Lot# 10899707731
- asetonitrili, VWR Hipersolv Chromanorm 83640.320 Lot # 18E294014
- puhdas vesi, MilliQ
- muurahaishappo 98-100 %, Formic Acid, VWR Hipersolv Chromanorm LC-MS, prod. 84885-180, Lot # FS640107
- suolahappo, HCl, Baker 6081 tai vastaava
- etanoli
- natriumkloridi, AnalaR NORMAPUR, VWR Chemicals 27810.295 Lot # 17K254130 ACS, Reag. Ph. Eur
- magnesiumsulfaatti, $MgSO_4$, vedetön, reagent grade $\geq 99.5\%$, Lot # MKCF0648, 1002682308

Esimerkki sisäisen standardiliuoksen valmistuksesta:

Sisäisen standardin pitoisuuden tuli olla 10 $\mu g/ml$ ja sitä tehtiin yhteensä 5 ml. Taulukon 1 mukaan pipetoitiin 50–500 μl kantaliuoksia, ja täytettiin metanolilla merkkiin asti. Valmista liuosta säilytettiin jääkaapissa.

Taulukko 1. 10 µg/ml sisäisen standardiliuoksen valmistus, pipetointitaulukko.

	ISTD:n nimi	Kantaliuoksen pitoisuus µg/ml metanolissa	Pipetoitu tilavuus/ 5 ml
1	d3-aminobendatsolisulfoni	100	500 µl
2	¹³ C ₆ - klosanteeli	100	500 µl
3	d3- triclabendatsoli	100	500 µl
4	d3- HMMNI	1000	50 µl
5	d3- ipronidatsoli	1000	50 µl
6	d3- fenyylibutatsoni	1000	50 µl
7	d4- diklofenakki	100	500 µl
8	d3- carprofen	10000	50 µl
9	d6- tetrasykliini	100	500 µl
10	¹³ C ₆ - sulfametatsiinifenyylihemihy- draatti	1000	50 µl

3.2 Laitteet ja tarvikkeet

Opinnäytetyössä käytettiin seuraavia laitteita ja tarvikkeita:

- ruiskusuodattimet, Agilent, # 5190-5082) PTFE 4mm, 0,2 μm
- dSPE putket, Waters, DisQue 2 ml tube, 150 mg MgSO_4 / 50 mg C18, # 186008075
- analyysivaaka, Mettler Toledo AX204
- yläkuppivaaka, Caliper Life Sciences
- tasoravistelijä, IKA-WERKE KS 501 digital
- jäädyttävä sentrifuugi 15-50 ml:n putkille, Heraeus, Megafuge 2,0 R (00005149)
- jäädyttävä sentrifuugi 1,5-2 ml: n putkille, Eppendorf Centrifuge 5415 C
- typpihaihdutin, Pierce Reacti Vap TM Model 18780 ja lämpömoduuli, Pierce Reacti Therm Heating Module Model 18790
- typpihaihdutin, Zymark Turbo Vap ® LV
- analysaattori: Agilent Technologies infinity II 1290 nestekromatografi, Agilent 6545 QTOF massaspektrometri (Sonet 7208)
- analyttinen kolonni: Waters, Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm , 2,1 x 100 mm, #186002352, Lot # 0339391082, serial 033939108525112



Kuva 4. Agilent Technologies 6545 Q-TOF LC/MS analyysilaitte. (kuva Marjo Mauriala).

Näytteenkäsittelyssä tuli käyttää vain menetelmäohjeessa mainittuja suodattimia, sillä esimerkiksi PVDF-suodattimet heikentävät joidenkin yhdisteiden saantoa huomattavasti. Ajoliuospulloina käytettiin vain laitteelle tarkoitettuja 1 litran pulloja. Laitteen kontaminoitumista pyrittiin välttämään käyttämällä näytteenkäsittelyn ja laitteen käytön aikana aina puhtaita nitrilihanskoja. Käsirasvojen yms. käyttöä oli vältettävä näytteenkäsittelyn aikana.

3.3 LC-HRMS-määrittely

3.3.1 LC-olosuhteet

Ajoliuksina käytettiin: 0,1-prosenttista muurahaishappoa (A) ja : 0,1-prosenttinen muurahaishappo asetonitrilissä (B). Virtausnopeus oli 0,4 ml/min ja injektioilavuus 5 µl.

Ajossa oli gradientti seuraavasti:

- Gradientti (positiivinen ESI)

Aika (min)	B-ajoliuos (%)
0,0	5%
1,0	5 %
15,0	60 %
15,5	95 %
18,0	95 %
18,5	5 %
21,0	5 %

- Gradientti (Negatiivinen ESI)

Aika (min)	B-ajoliuos (%)
0,0	5%
1,0	5 %
10,0	95 %
13,0	95 %
13,5	5 %
15,5	5 %

3.3.2 QTOF-parametrit

Parametrit ovat englanniksi, koska laite on englanninkielinen.

Tune Parameters:

<input type="checkbox"/>	Mass range	Low (1700 m/z)
<input type="checkbox"/>	Slicer Mode	High Resolution
<input type="checkbox"/>	Instrument Mode	Extended Dynamic Range (2 GHz)
<input type="checkbox"/>	Mass calibration	50-1700 m/z

Positive ESI

<input type="checkbox"/>	Capillary voltage (VCap)	2500 V
<input type="checkbox"/>	Gas temperature	300 C
<input type="checkbox"/>	Drying gas flow	10 l/min
<input type="checkbox"/>	Nebulizer pressure	35 psi
<input type="checkbox"/>	Sheath gas temperature	300 C
<input type="checkbox"/>	Sheath gas flow	11 l/min
<input type="checkbox"/>	Nozzle Voltage	500 V
<input type="checkbox"/>	Fragmentor	120 V
<input type="checkbox"/>	Mass range	m/z 100 – 1200
<input type="checkbox"/>	Cycle time	3 spectra/s
<input type="checkbox"/>	Transients/spectrum	2694
<input type="checkbox"/>	Analysis Mode	MS
<input type="checkbox"/>	Collision Energy	0 V, 20 V, 40 V
<input type="checkbox"/>	Reference masses	m/z 121,0509 m/z 922,0098

Negative ESI

<input type="checkbox"/>	Capillary voltage (VCap)-	2500 V
<input type="checkbox"/>	Gas temperature	300 C
<input type="checkbox"/>	Drying gas flow	10 l/min

<input type="checkbox"/>	Nebulizer pressure	35 psi
<input type="checkbox"/>	Sheath gas temperature	300 C
<input type="checkbox"/>	Sheath gas flow	11 l/min
<input type="checkbox"/>	Nozzle Voltage	500 V
<input type="checkbox"/>	Fragmentor	120 V
<input type="checkbox"/>	Mass range	m/z 90 – 1100
<input type="checkbox"/>	Cycle time	3 spectra/s
<input type="checkbox"/>	Transients/spectrum	2694
<input type="checkbox"/>	Analysis Mode	MS
<input type="checkbox"/>	Collision Energy	0 V, 20 V, 40 V
<input type="checkbox"/>	Reference masses	m/z 112,9855 m/z 1033,9881

3.3.3 Kriteerit laitteen suorituskyvyille

Ennen laitteen käyttöä, sen toimintakyky on tarkastettava seuraavalla tavalla: laiteelle tehdään viritys käytetyllä mittaamismoodilla (Extended Dynamic Range (2 GHz), Low (1700 m/z), High Resolution) ja massa-alue kalibroidaan.

Kalibroitiraportti tarkastetaan ja sen tulee vastata laiteohjeen LAB 6247 suositusarvoja. Resoluution tulee olla valvontakortin rajoissa sekä positiivisella että negatiivisella ionisaatiolla. Lisäksi ennen analyysisarjaa analysoidaan liuotinstandardi laitteen toimintakunnon varmistamiseksi. Liuotinstandardista tarkastellaan piikkien pinta-aloja sekä retentioaikoja.

Jokaisessa näytteessä referenssiluoksen yhdisteiden signaali tulee olla suurempi kuin 1000 koko näyteajon ajan. Yksittäisen yhdisteen massatarkkuuden on oltava ± 5 ppm, jotta positiivinen seulontatulokset voidaan hyväksyä. Lisäksi ionisuhdetta voidaan verrata standardinlisäysnäytteeseen.

4 Menetelmän kehitys

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää Ruokavirastolle menetelmä, jolla saataisiin analysoitua mahdollisimman laaja yhdistemäärä maidosta LC-HRMS-analyysillä. Analyysiin käytettävä laite oli Agilentin 6545 Q-TOF LC/MS.

Menetelmän kehitystyössä oli tarkoitus seuloa lääkaineita (mm. loislääkkeet, mikrobilääkkeet kuten sulfonamidit, tektrasykliinit, makrolidit, linkosamidit, kinolonit ja muut lääkaineet) maitonäytteistä. Tarkoituksena oli kehittää menetelmä, jolla analysoidaan pääasiassa vierasainevalvontaohjelmassa tutkittavia näytteitä. Menetelmän kehitystyössä ehdittiin tehdä kuusi eri testausta. Koska eri testeissä vertailtiin useita menetelmiä toisiinsa, tulokset on esitetty jokaisen testin yhteydessä opinnäytetyön lukemisen helpottamiseksi.

4.1 Saantokokeiden pitoisuustason määrittäminen

Ruokavirastolla oli tehty alustavia menetelmänkehityskokeita, jotka perustuivat BVL:n testimenetelmään "Screening method for determination of A6, B1, B2a, B2b and B2e in milk with HPLC-HRMS" 01.10.2018 (6). Opinnäytetyön ensimmäisessä kokeessa tehtiin standardisuora eri pitoisuuksilla, jotta voitaisiin määrittää pienin pitoisuus, jolla yhdisteet voisi luotettavasti analysoida.

Näytteiden käsittely testi 1:

- Pipetoitiin 5 ml:n maitonäyte (5-10 °C) muoviseen 15 ml:n koeputkeen. (Putket 1-8.)
- Tehtiin lääkeainesoksen lisäykset (0; 1; 2; 5; 10; 50; 100 ja 200 µg/kg), ravisteltiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin 15 min huoneen lämmössä.
- Lisättiin 2 ml asetonitriiliä, ravisteltiin vorteksilla 10 s.
- Lisättiin 1,6 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, ravisteltiin vorteksilla ja yritettiin välttää paakkujen muodostumista.
- Sekoitettiin tasoravisteijassa 15 min, 250 rpm.
- Sentrifugoitiin 4000 rpm, 4 °C, 10 min.

Taulukon 2 tulokset kertovat saantokokeiden pitoisuuden määrittämisen liikennevalovärein. Tulosten perusteella pienin lääkeainekonsentraatio, jolla saatiin eniten yhdisteitä näkymään oli 50 µg/kg. Tämä valittiinkin jatkotutkimusten pitoisuudeksi.

4.2 Uttoliuottimen ja ulossuolauksen testaus

Kirjallisuutta tutkimalla pyrittiin löytämään menetelmä, jolla saataisiin näkymään myös ne yhdisteet, joita edellisessä takaisinsaantokeessa ei havaittu. Seuraavan kokeen menetelmä perustui Sunin ym. (7) menetelmään, jossa maitonäytteeseen lisätiin vettä ja asetonitrili- uuttoliuokseen 1-prosenttia etikkahappoa. Myös suolojen määrää testattiin. Taulukko 3 esittää eri menetelmillä saadut tulokset. Vertaamalla tuloksia, parhaiten toimi menetelmä 2, eli 2,5 g suoloja ja hapan uuttoliuos.

Testissä 2 näytteenkäsittely tehtiin neljän eri menetelmän mukaan. Lääkeaineseosta lisätiin jokaiseen näytteeseen 50 µg/ kg. Ensimmäisessä menetelmässä on näytteenä vettä maidon sijaan. Tässä menetelmässä uuttoliuoksena oli pelkkä asetonitrili ja ulossuolauksessa lisätiin 2,5 g magnesiumsulfaattia. Toisessa menetelmässä uuttoliuoksena oli asetonitrili, johon oli lisätty 1-prosenttia etikkahappoa ja suolaa lisätiin sama määrä. Kolmannessa menetelmässä uuttoliuos on sama kuin toisessa, mutta suolaa lisätiin kaksinkertaisesti. Neljännessä menetelmässä uuttoliuottimena on asetonitrili ilman happoa ja ulossuolauksessa 2,5 g magnesiumsulfaattia.

Menetelmä 1 (vesi, 2,5 g MgSO₄)

- Pipetoitiin 2,5 ml vettä 50 ml:n muoviseen koeputkeen.
- Tehtiin lisäys (50 µg/kg), ravisteltiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin RT 15 min.
- Lisätiin vettä 4 ml, ravisteltiin vortexilla 1 min.
- Lisätiin 10 ml asetonitrili + 1-prosenttinen etikkahappo, ravisteltiin vorteksilla 1 min.
- Lisätiin 2,5 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, ravisteltiin vorteksilla 1 min.

- Sekoitettiin tasoravistelijassa 15 min, 250 rpm.
- Sentrifugoitiin 3000 rpm, huoneen lämmössä, 15 min.
- Inkuboitiin 30 min huoneen lämmössä.

Menetelmä 2 (asetonitrili ja 1-prosenttinen etikkahappo sekä 2,5 g MgSO₄)

- Pipetoitiin 2,5 ml näytettä (maitoa) 50 ml:n muoviseen koeputkeen.
- Tehtiin lisäys (50 µg/kg), ravisteltiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin huoneen lämmössä 15 min.
- Lisättiin vettä 4 ml, vorteksoitiin 1 min.
- Lisättiin 10 ml asetonitrili + 1-prosenttinen etikkahappo, ravisteltiin vorteksilla 1 min.
- Lisättiin 2,5 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, ravisteltiin vorteksilla 1 min.
- Sekoitettiin tasoravistelijassa 15 min, 250 rpm.
- Sentrifugoitiin 3000 rpm, 15 min huoneen lämmössä.
- Inkuboitiin 30 min huoneen lämmössä.

Menetelmä 3 (asetonitrili ja 1-prosenttinen etikkahappo, 5 g MgSO₄)

- Pipetoitiin 2,5 ml näytettä (maitoa) 50 ml:n muoviseen koeputkeen.
- Tehtiin lisäys (50 µg/kg), ravisteltiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin huoneen lämmössä 15 min.
- Lisättiin vettä 4 ml, ravisteltiin vortexilla 1 min.
- Lisättiin 10 ml asetonitrili + 1-prosenttinen etikkahappo, ravisteltiin vorteksilla 1 min.
- Lisättiin 5 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, ravisteltiin vorteksilla 1 min.
- Sekoitettiin tasoravistelijassa 15 min, 250 rpm.
- Sentrifugoitiin 3000 rpm, huoneen lämmössä, 15 min.
- Inkuboitiin 30 min huoneen lämmössä.

Menetelmä 4 (pelkkä asetonitrili sekä 2,5 g MgSO₄)

- Pipetoitiin 2,5 ml näytettä (maitoa) 50 ml:n muoviseen koeputkeen.
- Tehtiin lisäys (50 µg/kg), ravisteltiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin huoneen lämmössä 15 min.
- Lisättiin vettä 4 ml, vorteksoitiin 1 min.

- Lisättiin 10 ml asetonitrili + 1-prosenttinen etikkahappo, vorteksoitiin 1 min.
- Lisättiin 2,5 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, vorteksoitiin 1 min.
- Sekoitettiin tasoravistelijassa 15 min, 250 rpm.
- Sentrifugoitiin 3000 rpm, huoneen lämmössä, 15 min.
- Inkuboitiin 30 min huoneen lämmössä.

Kaikkia menetelmiä (1-4) jatkettiin inkuboinnista seuraavasti.

- Pipetoitiin ylintä asetonitrilifaasia 4 ml lasiseen koepitkeen.
- Haihdutettiin typpellä n. 1,5 ml:ksi, 40 °C.
- Pipetoitiin 1,2 ml dSPE putkeen, vorteksoitiin 1 min.
- Sentrifugoitiin 15 000 rpm, 4 °C, 10 min.
- Pipetoitiin supernatanttia 1,5 ml:n putkeen, haihdutettiin 100 µl:ksi typpellä.
- Lisättiin 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa, vorteksoitiin.
- Sentrifugoitiin 15 000 rpm, 4 °C, 10 min.
- Siirrettiin 400 µl suodatettua näytettä LC-pulloihin.

Taulukko 3 esittää eri menetelmillä saadut tulokset. Vertaamalla tuloksia, parhaiten toimi menetelmä 2, eli 2,5 g suoloja ja hapan uuttoliuos.

Taulukko 3. Uuttoliuottimen ja ulossuolauksen testitulokset. Tulokset on esitetty liikennevalovärein, vihreä= signaali yli 50 000, keltainen= signaali alle 50 000 ja punainen= ei signaalia.

Yhdiste	MRL (maito)	Polaarisuus	Konsentraatio 50 µg/kg			
			VESI, ACN + EtCOOH, 2,5 g	ACN + EtCOOH, 2,5g	ACN + EtCOOH, 5 g	ACN, 2,5 g
HMMNI		POS	276346	325231	411271	431663
Amoksisilliini	4	POS	16566	10626	4479	
Sulfadiatsiini		POS	378546	446334	574604	547906
Levamisoli		POS	1434020	1759998	2180251	2215513
Linkomysiini	150	POS	67501	396384	156048	564452
Kefaleksiini	100	POS	3293	2346	1490	0
Siprofloksaniini	100	POS	309589	100727	41632	702
Tulatromysiini		POS	2013	7036	7311	3954

Klooritetrazykliini	100	POS	8969	13883	5753	0
Ipronidatsoli		POS	1373554	1669276	2125339	2271853
Aminoflubendatsoli	10	POS	803905	947851	1172363	1284060
Deksametasoni	0,3	POS	120733	152379	193301	196811
Penisilliini V	25	POS	10203	12401	16069	6995
Fenyylibutasoni		POS	50298	97508	40503	47405
Ivermektiini B1A		POS	0	0	0	0
Kloramfenikoli		POS	1525	2052	3328	3727
Ketotriklabendatsoli	10	POS	35454	5557	10686	12755
Diklofenakki	0,1	POS	50925	14839	15124	20464
Ibuprofeeni		POS	0	0	0	0
Amoksisilliini	4	NEG	1131	977	0	0
Betamethazoni		NEG	111192	141386	183930	193688
Linkomysiini	150	NEG	2701	16797	6064	25748
Siprofloksaniini	100	NEG	4329	66655	23916	85550
Tulatromysiini		NEG	2935	4952	4601	5476
Aminoflubendatsoli	10	NEG	90447	102009	124045	126595
Penisilliini V	25	NEG	37791	44738	56307	27418
Fenyylibutasoni		NEG	6589	2722	2514	6040
Kloramfenikoli		NEG	78742	104077	132300	134459
Ketotriklabendatsoli	10	NEG	44867	5995	14132	17382
Klosanteeli	45	NEG	0	0	0	0
Rafoksanidi	10	NEG	0	0	0	0
Ibuprofeeni		NEG	0	0	0	0

4.3 Uttoliuottimien testaus

Kolmannessa testissä kokeiltiin, miten uuttoliuoksen happamuus tai emäksisyys vaikuttavat tutkittavien yhdisteiden analysointiin. Lisäksi tutkittiin, miten matriisi vaikuttaa signaaliin. Tässäkin verrattiin toisiinsa neljää eri menetelmää, joista ensimmäisessä käytettiin vettä maidon sijaan. Tämän testin tulokset on esitetty taulukossa numero 4, jälleen liikennevalovärein. Taulukosta käy ilmi, että uuttoliuoksista parhaiten toimi ACN + 1-prosenttinen etikkahappo (menetelmä 3).

Testissä verrattiin eri uuttoliuottimia keskenään: asetonitriliä, ACN + 1-prosenttinen etikkahappo sekä ACN + 0,1-prosenttinen NH₃ (ammoniakki). Lääkeaineseosta lisättiin 50 µg/kg jokaiseen näytteeseen.

Näytteenkäsittely uuttoluottimien testauksessa:

- Pipetoitiin 5 ml maitonäytettä (5-10 °C) 15 ml:n muoviseen koeputkeen.
- Tehtiin lisäys (50 ppb), ravisteltiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin 15 min huoneen lämmössä.
- Lisättiin 2 ml menetelmäkohtaista liuotinta ja ravisteltiin vorteksilla 10 s.
- Lisättiin 1,6 mg MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, ravisteltiin vorteksilla.
- Sekoitettiin tasoravistelijassa 250 rpm, 15 min.
- Sentrifugoitiin 4000 rpm, 4 °C, 10 min.

Menetelmä 1,(vesi ja ACN)

- Pipetoitiin 5 ml vettä maidon sijaan.
- Lisättiin 2 ml asetonitriliä, ravisteltiin vorteksilla.
- Sentrifugoinnin jälkeen pipetoitiin 1 ml ylintä asetonitriliifaasia 1,5 ml:n putkeen, tehtiin sisäisen standardin lisäys.
- Haihdutettiin 100 µl:ksi tyellä, 40 °C.

Menetelmä 2, (maito ja ACN)

- Sentrifugoinnin jälkeen pipetoitiin ylintä asetonitriliifaasia 1,5 ml:n putkeen, tehtiin sisäisen standardin lisäys.
- Haihdutettiin 100 µl:ksi tyellä, 40 °C.

Menetelmä 3, (maito ja ACN + 1-prosenttinen etikkahappo)

- Sentrifugoinnin jälkeen pipetoitiin ylintä asetonitrili + etikkahappo-faasia 1,5 ml:n putkeen, tehtiin sisäisen standardin lisäys.
- Haihdutettiin 100 µl:ksi tyellä, 40 °C.

Menetelmä 4, (maito ja ACN + 0,1 % NH₃)

- Sentrifugoinnin jälkeen pipetoitiin ylintä asetonitrili + 0,1-prosenttista NH₃- faasia 1,5 ml:n putkeen, tehtiin sisäisen standardin lisäys.

- Haihdutettiin 100 µl:ksi typpellä, 40 °C.

Kaikki menetelmät (1-4):

- Haihdutuksen jälkeen lisättiin 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa.
- Sentrifugoitiin 15 000 rpm, 4° C, 10 min.
- Siirrettiin 400 µl supernatanttia suodattimen läpi LC- pulloihin.

Taulukko 4. Uttoliuottimien testauksen tulokset. Liikennevalovärein on merkitty, miten saantokokeen analyysi on kunkin analyytin kohdalla onnistunut.

Testin 3. tulokset.

konsentraatio 50 µg/kg

Yhdiste	MRL (maito)	Polaarisuus	VESI	ACN	ACN + 1% EtCOOH	ACN + 0,1% NH ₃
HMMNI		POS	1234400	1108000	1166100	1136400
Amoksisilliini	4	POS				
Sulfadiatsiini		POS	1012100	1795700	1969600	1852700
Levamisoli		POS	8405900	5269200	7364200	7242200
Linkomysiini	150	POS	3066300	811100	768700	903600
Kefaleksiini	100	POS				
Siprofloksaniini	100	POS			45800	
Tulatromysiini		POS	78200	27400	52500	23600
Klooritetrasykliini	100	POS	2300	7200	21900	6700
Ipronidatsoli		POS	7928700	7001100	6605300	7264000
Aminoflubendatsoli	10	POS	4341100	2926200	2787100	3096900
Deksametasoni	0,3	POS	777700	679500	721300	709700
Penisilliini V	25	POS	41000	19700	48300	20500
Fenyylibutasoni		POS	624300	166100	85200	131300
Ivermektiini B1A		POS	28000			
Kloramfenikoli		POS	10100	8400	9800	8800
Ketotriklabendatsoli	10	POS	214600	49700	27800	33800
Diklofenakki	0,1	POS	325000	75700	68200	62400
Klosanteeli	45	POS				
Rafoksanidi	10	POS				
Ibuprofeeni		POS				
Amoksisilliini	4	NEG				
Betamethazoni		NEG	814200	689200	735000	711500
Linkomysiini	150	NEG	151500	35600	32200	40400

Siprofloksaniini	100	NEG		111700	117000	131300
Tulatromysiini		NEG	32900	22400	24700	21700
Aminoflubendatsoli	10	NEG	555700	312400	303100	328800
Penisilliini V	25	NEG	158400	76800	176700	77700
Fenyylibutasoni		NEG	84400	16300	7800	12800
Kloramfenikoli		NEG	532700	442900	474500	454300
Ketotriklabendatsoli	10	NEG	367200	82800	41800	54600
Klosanteeli	45	NEG				
Rafoksanidi	10	NEG				
Ibuprofeeni		NEG				

Taulukosta 4 käy ilmi, että uuttoluoksista parhaiten toimi ACN + 1-prosenttinen etikkahappo (menetelmä 3).

4.4 Haihtuvuustestaus

Koska tähän asti kehitettävässä menetelmässä oli haihdutusvaihe, jolla konsentroidiin tutkittavat yhdisteet, päätettiin testata, mitä tapahtuu, jos näytteet haihdutettaisiin ihan kuivaksi asti. Haihdutustestin saantokoiden tulokset on kuvattu pylväsdiagrammein kuvissa 5 ja 6. Kuvista näkee, että osittain haihdutetut näytteet antavat paremman saannon kuin kuiviin haihdutetut. Tämän testin mukaan mm. yhdisteet klosanteeli ja rafoksanidi haihtuvat liiksi, ja siten niitä ei ole saatu aiemmin analysoitua. Vaihtoehtoisesti ne hajosivat tai eivät haihdutuksen jälkeen lienneet uudestaan.

Rinnakkaisnäytteet A1 ja A2:

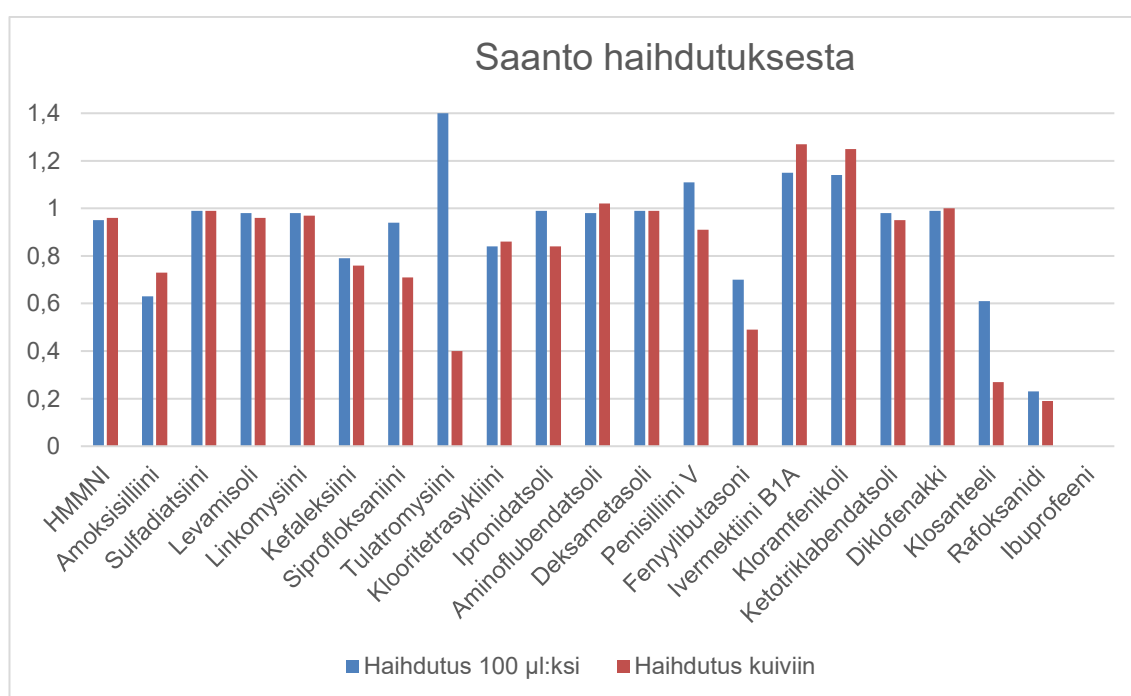
- 1 ml ACN + 25 µl VD MIX 1 µg/ ml
- Haihdutettiin 100 µl:ksi ja lisättiin 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa
- 400 µl pipetoitiin LC- putkiin.

B1:

- 25 µl VD MIX + 75 µl ACN + 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa.
- 400 µl pipetoitiin LC- putkiin.

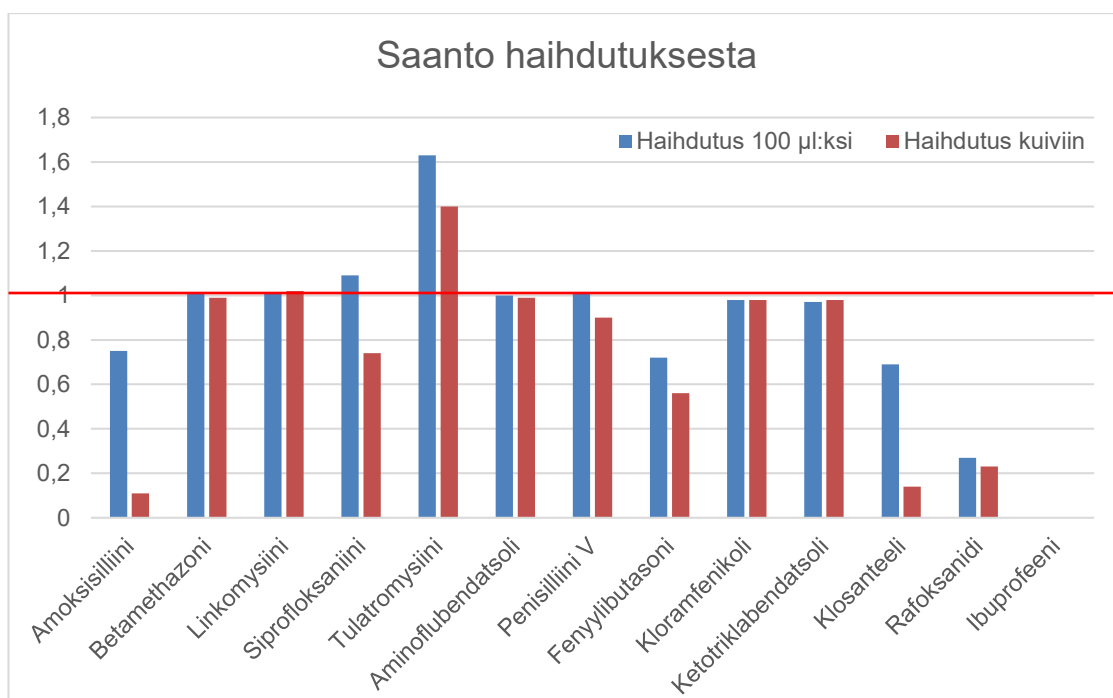
Rinnakkaisnäytteet C1 ja C2:

- 1 ml ACN + 25 µl VD MIX
- Haihdutettiin kuivaksi tyvellä.
- Lisättiin 100 µl ACN + 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa.
- 400 µl pipetoitiin LC- putkiin.



Kuva 5. Haihtuvuustestin tulokset positiivisella ionisaatiolla.

Esimerkiksi tulatromysiinin ja klosanteelin saanto on kuiviin haihdutettaessa vain noin kolmasosa siitä mitä se on, kun verrataan vain osittain haihdutettuihin näytteisiin.



Kuva 6. Haihtuvuustestin tulokset negatiivisella ionisaatiolla.

Kuvista 5 ja 6 näkee, että osittain haihdutetut näytteet antavat paremman saannon kuin kuiviin haihdutetut. Tämän testin mukaan mm. yhdisteet klosanteeli ja rafoksanidi haihtuvat liaksi, tai ne hajoavat tms. Niitä ei ole saatu aiemmin analysoitu.

4.5 Uttoliuottimien testaus laajennetulla yhdistemäärällä

Tässä viidennessä testissä päätettiin luopua muutamasta lääkeaineesta, jotka oli vaikea saada analysoiduksi. Jatkotestauksista jätettiin pois penisilliini V, fenyylibutasoni, amoksisilliini ja ibuprofeeni. Aiemmin mukana testiliuoksessa oli vain muutama ryhmää hyvin edustava lääkeaine niistä lääkeaineryhmistä, joita menetelmällä toivottiin jatkossa analysoitavan. Testiliuoksella haluttiin tehdä yksinkertaistetusti ensimmäiset näytteenkäsittelytestit, ennen kuin otettiin mukaan kaikki lääkeaineet. Nyt päätettiin laajentaa tutkittavien yhdisteiden joukkoa kattamaan kaikki lääkeaineet. Ne jaettiin kolmeen ryhmään: A-näytteistä tutkittiin sulfonamidit, tetrasykliinit, ja makrolidit, B-näytteistä tutkittiin aminoglykosidit, bentsimidatsolit ja nitroimidatsolit ja C-näytteistä tutkittiin kinolonit, oksolonihiappo, kortikosteroidit sekä linkosamidit. Lisäksi haluttiin vielä

vertailla kahta eri uutoliuotinta: asetonitriiliä sekä ACN+ 1% etikkahappoa. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaiset testit. Näytteisiin lisättiin puolet vaaditusta MRL-pitoisuudesta.

Näytteenkäsittelyt, testi 5:

- Pipetoitiin 5 ml maitonäytettä (5-10 °C) 15 ml:n muoviseen koeputkeen.
- Tehtiin lisäykset taulukoiden A, B tai C mukaan, sekoitettiin vorteksilla 5 s ja inkuboitiin 15 min huoneen lämmössä.
- Lisättiin 2 ml menetelmäkohtaista liuotinta (M1 tai M2), sekoitettiin vorteksilla 10 s.
- Lisättiin 1,6 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl, sekoitettiin vorteksilla.
- Sekoitettiin tasoravistelijassa 250 rpm, 15 min.
- Sentrifugoitiin 4000 rpm, 4° C, 10 min.

Menetelmä 1 (ACN)

- Pipetoitiin 1 ml ylintä asetonitriilifaasia 1,5 ml:n putkeen, lisättiin sisäinen standardi.
- Haihdutettiin 100 µl:ksi tyellä, 40 °C.

Menetelmä 2 (ACN + 1% etikkahappo)

- Pipetoitiin 1 ml ylintä ACN+ 1-prosenttista etikkahappofaasia 1,5 ml:n putkeen, lisättiin sisäinen standardi.
- Haihdutettiin 100 µl:ksi tyellä, 40 °C.

Molemmat menetelmät

- Lisättiin 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa.
- Sentrifugoitiin 15 000 rpm , 4 °C, 10 min
- Siirrettiin 400 µl näytettä LC-pulloihin ruiskusuodattimen läpi

Taulukko 5. Pipetointitaulukot näytteille A, B ja C.

NÄYTE A

#	Menetelmä	Sulfonamidit 10 µg/ml	Tetrasykliin it 10 µg/ml	Makrolidit 10 µg/ml	Spiikkaus VD-MIX- ISTD_002 10 µg/ml
	Pitoisuus näytteessä	= 50 ppb	= 50 ppb	= 25 ppb	
1.1A	Menetelmä 1	25 µl	25 µl	12,5 µl	25 µl
1.2A	Menetelmä 1	25 µl	25 µl	12,5 µl	25 µl
2.1A	Menetelmä 2	25 µl	25 µl	12,5 µl	25 µl
2.2A	Menetelmä 2	25 µl	25 µl	12,5 µl	25µl

NÄYTE B

#	Menetelmä	Aminoglykos idit 10 µg/ml	Bentsimidats olit 1 µg/ml	Nitroimidats olit 0,1 µg/ml	VD-MIX- ISTD_002 10 µg/ml
	Pitoisuus näyt- teessä	= 100 ppb	= 17 ppb	= 1 ppb	
1.1B	Menetelmä 1	50 µl	1. 83 µl	50 µl	25 µl
1.2B	Menetelmä 1	50 µl	2. 83 µl	50 µl	25 µl
2.1B	Menetelmä 2	50 µl	3. 83 µl	50 µl	25 µl
2.2B	Menetelmä 2	50 µl	4. 83 µl	50 µl	25 µl

NÄYTE C

#	Menetelmä	Kinolonit 10 µg/ml+ oxo 10 µg/ml	Kortikosteroidit 0,015/0,3 µg/ml	Linkosamidit 10 µg/ml	Spiikkaus VD-MIX- ISTD_002 10 µg/ml
	Pitoisuus näytteessä	= 25 ppb	= 0,3/1,5 ppb	= 50 ppb	
1.1C	Menetelmä 1	12,5 µl + 12,5 µl	75 µl	25 µl	25 µl
1.2C	Menetelmä 1	12,5 µl + 12,5 µl	75 µl	25 µl	25 µl
2.1C	Menetelmä 2	12,5 µl + 12,5 µl	75 µl	25 µl	25 µl
2.2C	Menetelmä 2	12,5 µl + 12,5 µl	75 µl	25 µl	25µl

Seuraavissa talulukoissa on esitetty testin 5 tulokset. Testissä tutkittiin, näkykö lääkeaineen signaali positiivisella vai negatiivisella kanavalla tai molemmilla tai ei näy ollenkaan. Lisäksi tutkittiin miten happamampi uuttoliuos toimii verrattuna puhtaaseen asetonitriliin.

Taulukko 6. Tulokset näytteistä A, B ja C liikennevalovärein.

Näyte A Nimi	Pitoisuus µg/kg	Polariteetti		Polariteetti	
		POS	POS	NEG	NEG
		ACN	ACN+EtCOOH	ACN	ACN+EtCOOH
Sulfadiatsiini	50				
Sulfadimetoksiini	50				
Sulfadoksiini	50				
Sulfakinoksaliini	50				
Sulfakloropyridatsiini	50				

Näyte A Nimi	Pitoisuus µg/kg	Polariteetti		Polariteetti	
		POS	POS	NEG	NEG
		ACN	ACN+EtCOOH	ACN	ACN+EtCOOH
Sulfameratsiini	50				
Sulfametatsiini	50				
Sulfametoksatsoli	50				
Sulfametoksypridatsiini	50				
Sulfapyridiini	50				
Sulfatiatsoli	50				
Sulfisoksatsoli	50				
Tetrasykliini	50				
Doksisykliini	50				
Oksitetrasykliini	50				
Klooritetrasykliini	50				
Tulatomysiini	25				
Tylosiini	25				
Tylvalosiini	25				

Näyte B Nimi	Pitoisuus µg/kg	Polariteetti		Polariteetti	
		POS	POS	NEG	NEG
		ACN	ACN+ EtCOOH	ACN	ACN +EtCOOH
Dihydrostreptomysiini	100				
Streptomysiini	100				
Albendatsoli	17				
Albendatsoli- aminosulfoni	17				
Albendatsolisulfoksidi	17				
Albendatsolisulfoni	17				
Aminoflubendatsoli	17				
Cloantel	17				
Fenbendatsoli	17				
Fenbendatsoli-sulfoksidi	17				
Fenbendatsolisulfoni	17				
Flubendatsoli	17				

Näyte B Nimi	Pitoisuus µg/kg	Polariteetti		Polariteetti	
		POS	POS	NEG	NEG
		ACN	ACN+ EtCOOH	ACN	ACN +EtCOOH
Hydroksitiabendatsoli	17				
Hydroksitriclabendatsoli	17				
Ketotriclabendatsoli	17				
Levamisoli	17				
Mebendatsoli	17				
Nitroksiniili	17				
Oksibendatsoli	17				
Oxyclozanide	17				
Rafoksanidi	17				
Tiabendatsoli	17				
Triclabendatsoli	17				
Triclabendatsoli- sulfoksidi	17				
Triclabendatsolisulfony	17				
Dimetridatsoli	10				
HMMNI	10				
Ipronidatsoli	10				
Metronidatsoli	10				
Ronidatsoli	10				
Hydroksimetronidatsoli	10				
Hydsoкси-ipro-nidatsoli	10				

Näyte C Nimi	Pitoisuus µg/ kg	Polariteetti		Polariteetti	
		POS	POS	NEG	NEG
		ACN	ACN +EtCOOH	ACN	ACN +EtCOOH
Danofloksasiini	25				
Difloksasiini	25				
Flumekiini	25				

Näyte C Nimi	Pitoisuus µg/ kg	Polariteetti		Polariteetti	
		POS	POS	NEG	NEG
		ACN	ACN +EtCOOH	ACN	ACN +EtCOOH
Enrofloksasiini	25	Red	Green	Red	Red
Marbofloksasiini	25	Yellow	Green	Red	Red
Nalidiksiinihappo	25	Green	Green	Red	Red
Norfloksasiini	25	Red	Yellow	Red	Red
Oksoliinihappo	25	Green	Green	Red	Red
Sarafloksasiini	25	Yellow	Green	Red	Red
Siprofloksasiini	25	Red	Yellow	Red	Red
Beetametasoni	0,3	Red	Red	Red	Red
Deksametasoni	0,3	Red	Red	Red	Red
Metyyliprednisoloni	1,5	Red	Red	Red	Red
Prednisoloni	1,5	Red	Red	Red	Red
Klindamysiini	50	Green	Green	Green	Green
Linkomysiini	50	Green	Green	Green	Green
Pirlimysiini	50	Green	Green	Green	Red

4.6 Uttoliuoksen määrän testaus laajennetulla yhdistemäärällä

Viimeisessä opinnäytetyöhön liittyvässä testissä verrattiin uuttoliuoksen määrän vaikutusta sekä ulossuolausta QuEChERS-menetelmällä ja QuEChERS + dSPE– dispersiivisellä kiinteäfaasiuuttomenetelmällä. Tulokset on esitetty kuvissa 7 ja 8.

Testi perustuu menetelmiin MSM_002-Version of 01.10.2018 (BLV:n menetelmä)(6), sekä Sunin ym. (Agilent Technologies)(7). Tässä testissä on kaikki lääkeaineet mukana ja tutkitaan, miten eri määrä uuttoliuosta vaikuttaa tuloksiin. Lisäksi testataan, miten dSPE eli dispersiivinen kiinteäfaasiuutto esikäsittelyn lopussa vaikuttaa. Kustakin näytteestä tehtiin rinnakkaiset analyysit.

Näytteenkäsittely, testi 6:

- Pipetoitiin 5 ml maitonäytettä 15 ml:n koeputkeen.
- Tehtiin lisäykset Taulukon A tai B mukaan, ravisteltiin vorteksoimalla 5 s ja inkuboitiin 15 min huoneen lämmössä.
- Lisättiin 2 ml ACN + 1-prosenttinen etikkahappo uuttoliuosta näytteisiin 1 ja 3, ravisteltiin vorteksoimalla 10 s.
- Lisättiin 4 ml ACN + 1-prosenttinen etikkahappo uuttoliuosta näytteisiin 2, ravisteltiin vorteksoimalla 10 s.
- Lisättiin 1,6 g MgSO₄ ja 0,4 g NaCl suoloja, ravisteltiin vorteksoimalla.
- Sekoitettiin tasoravistelijassa 250 rpm, 15 min.
- Sentrifugoitiin 3000 rpm, 4 C, 10 min.

Menetelmä 1

- Otettiin 1 ml ylintä faasia 1,5 ml:n putkeen.
- Lisättiin sisäinen standardi.

Menetelmä 2

- Otettiin 3 ml ylintä faasia lasiseen koeputkeen.
- Lisättiin sisäinen standardi.

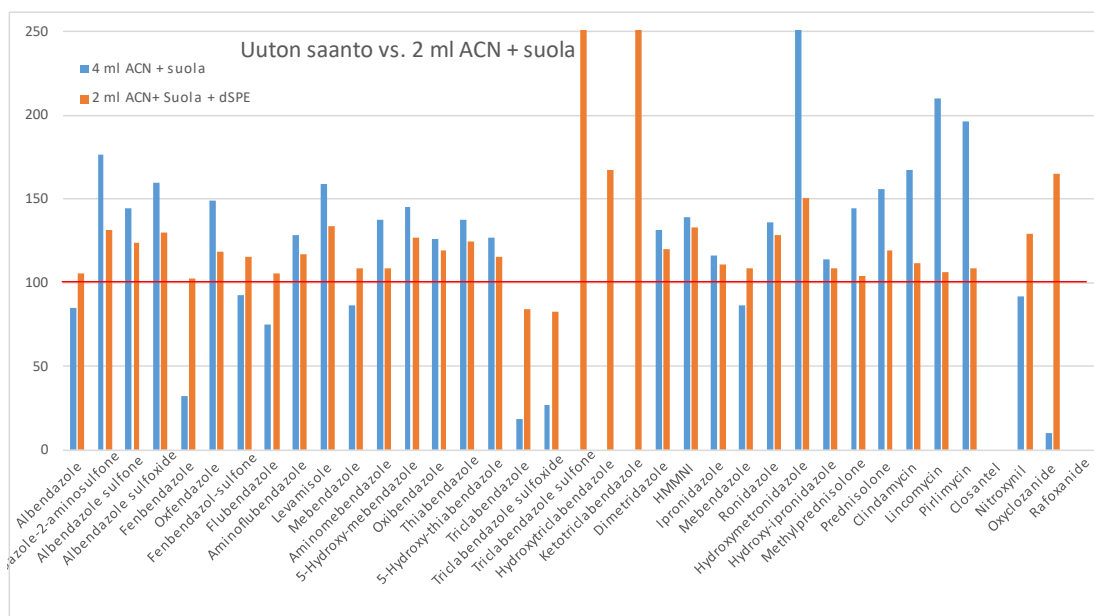
Menetelmä 3

- Otettiin 1,2 ml ylintä faasia dSPE-putkeen, vorteksoitiin 1 min.
- Sentrifugoitiin 15 000 rpm, 4C, 10 min.
- Pipetoitiin 0,9 ml supernatanttia 1,5 ml:n putkeen.
- Lisättiin sisäinen standardi.

Menetelmät 1,2 ja 3 sisäisen standardin lisäyksen jälkeen:

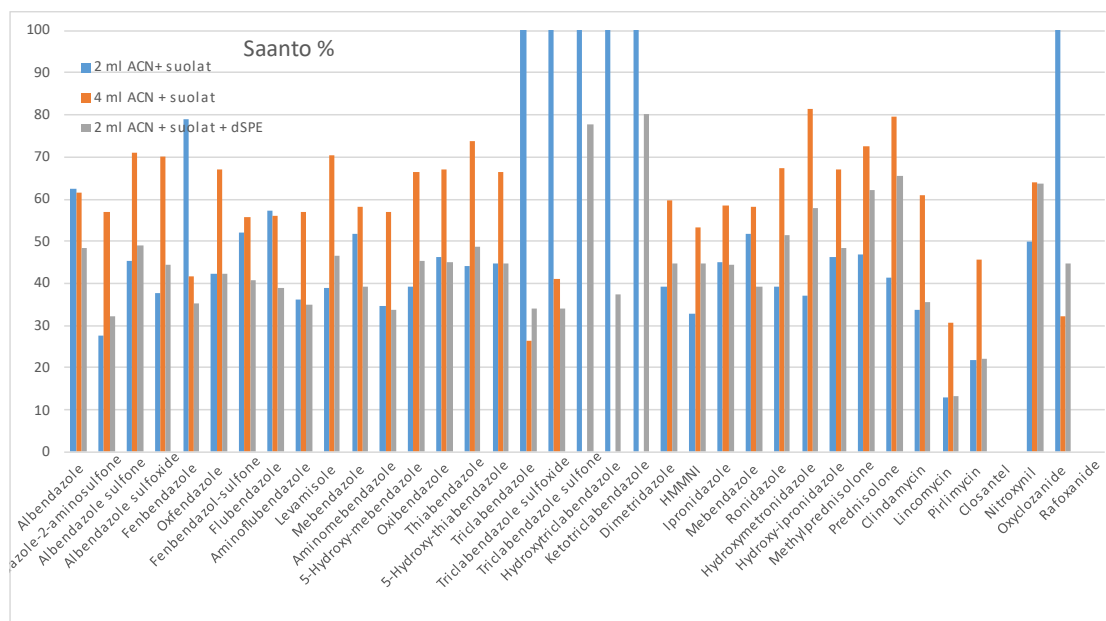
- Haihdutettiin näytteet noin 100 µl:ksi typpellä, 40 °C.
- Lisättiin 400 µl 0,1-prosenttista muurahaishappoa.

- Sentrifugoitiin 15 000 rpm, 4 °C, 10 min.
- Siirrettiin 400 µl näytettä LC-pulloihin suodattimen läpi.



Kuva 7. Testin 6 saantokokeiden tulokset pylväsdiagrammina.

Kuvassa 7 on vertailtu uuttoa QuEChERS-menetelmään, jossa on 2 ml hapanta asetonitriliä ja suoloja. Sinisellä on kuvattu testiä, jossa liuotinta on puolet enemmän kuin toisessa. Oranssilla on kuvattu saantokokeen tulokset, missä QuEChERS-menetelmän lisäksi on tehty dSPE-puhdistus. Kuvassa 100% (punainen viiva) kuvaa uuttoa prosentteina suhteessa 2 ml asetonitrili -uuttoon, eli mikäli saanto on suurempi kuin 100 %, se tarkoittaa, että kyseisen menetelmän saanto on 2 ml asetonitriliuuttoa parempi.



Kuva 8. Testin 6 tulokset pylväsdiagrammina.

Kuvassa 8 on mukana kaikki tutkitut lääkeaineet ja kolmen eri menetelmän saantokokeita on verrattu keskenään. Pylväsdiagrammista voi havaita, että oranssit pylväät antavat keskinäisiin 50-80 %:n saannon, eli paras menetelmä olisi näistä 4 ml hapanta asetonia + ulossuolaus QuEChERS-menetelmällä. Triklabendatsolin ja sen metabolittien tulokset tulee jättää huomioimatta, sillä kyseisille yhdisteille LC-HRMS -määrityksessä signaali oli heikko ja ei-toistettava, jolloin saantoprosenttia ei voitu luotettavasti määrittää. Molemmista pylväsdiagrammeista voidaan nähdä, että QuEChERS-menetelmä, jossa hapanta uuttoliuotinta on 4 ml, toimii parhaiten.

5 Johtopäätökset

Työ osoittautui erittäin haasteelliseksi. Kun kaikki yhdisteet, jotka ovat ominaisuuksiltaan hyvin erilaisia, on analysoitava samalla menetelmällä, on menetelmänkehityksessä tyydyttävä kompromisseihin. Saantokokeita vertailemalla työn tärkeimmäksi havainnoksi tuli se, että jotkut yhdisteet haihtuvat muita herkemmin, tai saanto on huonompi koska tutkittava aine on hajonnut tai se ei ole liuennut uudelleen haihdutuksen jälkeen.

Opinnäytetyöllä oli erittäin suuri merkitys, sillä nämä ensimmäiset testit ovat olleet ratkaisevia kun uutta menetelmää on kehitetty. Menetelmä on nyt valmis ja otettu rutiinikäyttöön Ruokavirastossa (8). Lopulliseen menetelmään tuli loppujen lopuksi ulossuolauksessa magnesiumsulfaatin tilalle ammoniumsulfaatti, koska tetrasykliinit kelatoituivat magnesiumsulfaatin läsnäollessa. Lisäksi liuottimeen lisättiin heksaania, jotta maidon rasvoista päästiin eroon.

Menetelmän kehitys vaati perehtymistä ja kirjallisuuteen tutustumista. Useiden lääkeaineiden kohdalla tuli tyytyä kompromissiin, eli siihen että analyysitulokset on tarpeeksi riittävät. Kaikista tutkittavista aineista ei saatu optimaalista tulosta.

Lähteet

- 1 Attila, Martti & Sandholm, Markus. 1998. Lääkeaineet eläimissä, Farmakokinetiikan perusteet 2. painos.
- 2 Majors, Ronald E., Agilent Technologies, 2013. Sample preparation fundamentals for chromatography (s. 80-84).
- 3 Jaarinen, S. & Niiranen J. 2008. Laboratorion analyysitekniikka. 5.-6. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.
- 4 Ketola, Raimo, Kostianen Risto, Kotiaho Tapio & Vainiotalo Pirjo, 2010. Massaspektrometrian perusteet.
- 5 Chemicool. 2014. Definition of quadrupole mass spectrometry. [Verkkosivusto]. [Viitattu 2.5.2021] Saatavana: http://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html
- 6 Polzer, 2018. Screening method for the determination of A6, B1, B2a, B2b and B2e in milk with HPLC-HRMS. Test Method (BVL), Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- 7 Sun Jin-Lan, Liu Chang & Song Yue, Agilent Technologies 2012. Screening 36 Veterinary Drugs in Animal Origin Food by LC/MS/MS Combined with Modified QuEChERS Method.
- 8 Mauriala, Marjo, 2021. LM8620 Monijäämämenetelmä lääkeaineiden seulomiseksi maidosta LC-HRMS- tekniikalla. Ruokavirasto, Laboratorio- ja tutkimuslinja/ Kemian yksikkö.

