



*A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Tolokán Adrienn*

Szteroidszármazékok LC-MS/MS módszerű analízise: szelektív minta-előkészítési eljárások kevert módú szilárd fázisú extrakció és pH-kontroll alkalmazásával

Kulcsszavak:

LC-MS/MS, szilárd fázisú extrakció, kevert módú ioncserélők, pH, szteroidok

1. Összefoglalás

Az állatgyógyászati szerek maradékainak és a tiltott hozamfokozóknak a vizsgálata az állati eredetű élelmiszerekben az élelmiszer-vizsgálatok egyik legnagyobb és fontosabb területe. A hatékony vizsgálatok feltétele olyan precíz módszerek kidolgozása, amelyek kielégítik a modern analitika szelektivitásra, alacsony kimutatási határra és pontosságra vonatkozó követelményeit. A folyadékkromatográfiás hármasszoros kvadrupol rendszerű tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) módszerek nagyfokú érzékenysége és szelektivitása lehetőséget biztosít a szerves célvegyületek nyomnyi kimutatására összetett minták esetén is. Az LC-MS/MS módszerek megbízhatósága ugyanakkor nagymértékben függ az analízist megelőző minta-előkészítéstől, amelynek lényege a célvegyületekkel együtt eluálódó mátrixalkotók koncentrációjának csökkentése, ezáltal a mátrixhatás minimalizálása a készülék ionforrásában. Gyakran alkalmaznak a minta-előkészítések során kis hatékonyságú folyadékkromatográfiás tisztítást, az ún. szilárd fázisú extrakciót (Solid Phase Extraction -SPE). Az eluens kémhatása a folyadékkromatográfiában az egyik legfontosabb paraméter, így a pH megfelelő megválasztása az extrakció során döntően befolyásolhatja a minta-előkészítést és ez által az analízis pontosságát. Különösen helytálló ez a megállapítás akkor, amikor protonfunkciós mátrixvegyületeket kell eltávolítani a vizsgálati mintából. Közleményünk célja olyan kevert módú SPE minta-előkészítések bemutatása, amelyek jól demonstrálják a pH-kontroll szükségét az extrakció során. A példák között neutrális és bázikus jellegű célvegyületek meghatározása is szerepel kevert módú erős ioncserélő SPE oszlopok alkalmazásával.

2. Előszó

Dr. Fekete Jenő professzor úr elválasztástechnikai előadásait mindig nagy érdeklődéssel hallgattam a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen. Tanár úrral a közös kutató munkát az Európai Unió Átmeneti Támogatási Projekt keretén belül kezdtük meg 2008-ban. Öt év alatt 11 nemzetközi

folyóiratban közölt publikációt készítettünk közösen, amikben a minta-előkészítés és a pH megválasztás fontosságát hangsúlyoztuk az egyes kidolgozott módszerekben. Tanár úr már az egyetemi előadásai során is többször kiemelte, hogy a pH megfelelő beállítása a folyadékkromatográfiás elválasztás és a minta-előkészítés kulcselme. Jelen közleménnyel Dr. Fekete Jenő professzor úrra szeretnék emlékezni.

¹ Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, Élelmiszer Toxikológiai Nemzeti Referencia Laboratórium

² Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Texas A&M University

3. Bevezetés

3.1. Monitoring vizsgálatok

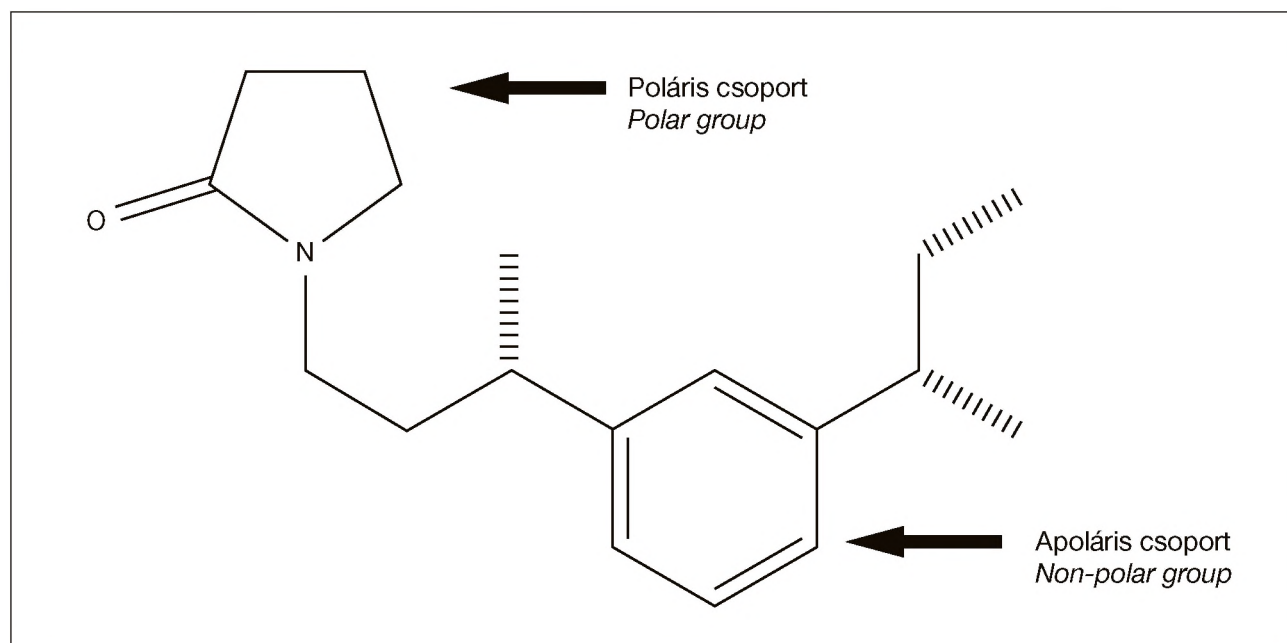
A biztonságos élelmiszerhez való jogot olyan – az alaptörvényében rögzített – alapjognak tekintjük, amely minden ember veleszületett és tőle elidegeníthetetlen emberi joga [1]. Az Európai Unió (EU) és így Magyarország közös céljai közé tartozik ennek az alapjognak minél szélesebb körű érvényesítése, ezért nagy hangsúlyt fektetnek az élelmiszervizsgálatok folyamatos végzésére és az ehhez szükséges analitikai módszerek folyamatos fejlesztésére.

Hazánkban, ahol a nemzeti össztermék előállításában a mezőgazdasági termelésnek kiemelt szerepe van, az agrártermékek ellenőrzése az Unión belüli szabad verseny miatt is fokozott figyelmet érdemel. Magyarországon az élelmiszer-toxikológiai megfigyelő vizsgálatokat és ellenőrzéseket (monitoring vizsgálatokat), azok menetét és az adott évi monitoring terv elkészítésének folyamatát a 10/2002 (I.23.) FVM rendelet írja elő és határozza meg [2]. A vizsgálatok az állatgyógyászati szerek maradékainak jelenlétére terjednek ki állatokban, azok ivóvizében és minden olyan mátrixban, amely az állatok tenyésztésével, tartásával kapcsolatosak [2]. A monitoring vizsgálatok célja a tiltott szerek jogellenes alkalmazásának felügyelete, illetve az engedélyezett szerek szakszerűtlen alkalmazásának felderítése. A mintaszám a vágási számmal évről-évre együtt változik, s az Élelmiszer Toxikológiai Nemzet Referencia Laboratórium évente több ezer mintát vizsgál különböző maradékanyagok mennyiségének ellenőrzése céljából. A kortikoszteroid szermaradékok és a sztozolol metabolitok vizsgálata az élelmiszertermelő állatok vizeletében és az állati eredetű élelmiszerekben 2008 óta az élelmiszerellenőrző hatóság egyik fő feladata.

A felügyeleti tevékenység hatékonyságának feltétele a gyors, pontos és precíz analitikai módszerek alkalmazása, ami megköveteli a modern analitikai technika alkalmazását. Az Élelmiszer Toxikológiai Nemzet Referencia Laboratórium 5. témacsoportjában az állatgyógyászati szerek maradékainak megerősítő (konfirmációs) vizsgálati nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel folynak. A mátrixok összetettsége és az alacsony koncentrációk meghatározásának igénye miatt a hagyományos UV vagy diódasoros (Diode Array Detector - DAD) detektálással elérhető érzékenység és szelektivitás nem minden esetben kielégítő, a fluoreszcenciás detektálás (Fluorescens Detektor - FLD) pedig nem minden molekula vizsgálata céljára alkalmas. A mai, korszerű folyadékkromatográfiás (LC) meghatározások kapcsolt technikák alkalmazásával érik el a kellő szelektivitást és a szükséges alacsonyabb kimutatási határt (LOD) [3]. A kapcsolt technikák közül a folyadékkromatográfiás hármaskvadropol rendszerű tandem tömegspektrometriás (LC-MS/MS) elválasztás az egyik legjobb minőségi és mennyiségi eredményt biztosító analitikai technika. Megjegyezzük azonban, hogy az LC-MS/MS technikán alapuló módszerek alkalmazásával is csak kellően gondos minta-előkészítés után tudunk megfelelő analitikai teljesítmény-jellemzőkkel rendelkező koncentráció értéket szolgáltatni.

3.2. Minta-előkészítés, szilárd fázisú extrakció

Az LC-MS/MS-mérések során a minta-előkészítés célja a célvegyületekkel együtt eluálódó mátrixalkotók számának és koncentrációjának csökkentése, ezáltal a mátrixhatás redukálása. Az együtt eluálódó mátrixkomponensek ugyanis a célvegyületek ionizációját befolyásolják az ionforrásban. Ideális esetben a mátrixalkotó nem hat a célkomponens ionizációjára. A gyakorlatban ugyanakkor rendszeres az ún. ionel-



1. ábra. Példa hidrophil módosított kopolimer töltetre.
Figure 1. An example for a hydrophilic modified co-polymer adsorbent.

nyomás, amikor is a koelválódó mátrixalkotók csökkentik a célkomponens ionizációját az ionforrásban. Olyan jelenség is előfordulhat, hogy a mátrixvegyületek az analit ionizációját nem elnyomják, hanem javítják az ionforrásban, ilyenkor ionerősítésről beszélünk [3]. A célkomponensnek az ionforrásban történő ionizációját befolyásoló hatásokat nevezzük mátrixhatásnak az LC-MS/MS technikánál. A minta-előkészítés további célja lehet a célkomponensek dúsítása, amikor az extrakciós lépések során koncentrálnak a célkomponenseket. Fontos hangsúlyozni, hogy a minta dúsításával a vizsgálati mintában a mátrixvegyületek koncentrációját is növeljük, ami magasabb mátrixhatást eredményezhet.

A minta-előkészítés két főreszből tevődik össze: a minta extrakciója és az extraktum tisztítása (clean-up). A minta tisztítása elkerülhető lépés, ha a készülék érzékenysége vagy a célvegyület magas koncentrációja lehetővé teszi az extraktum további hígítását („dilute and shoot” módszerek). Abban az esetben viszont, mikor a minta dúsítása szükséges, akkor a tisztítási lépéseknek fontos szerepük van.

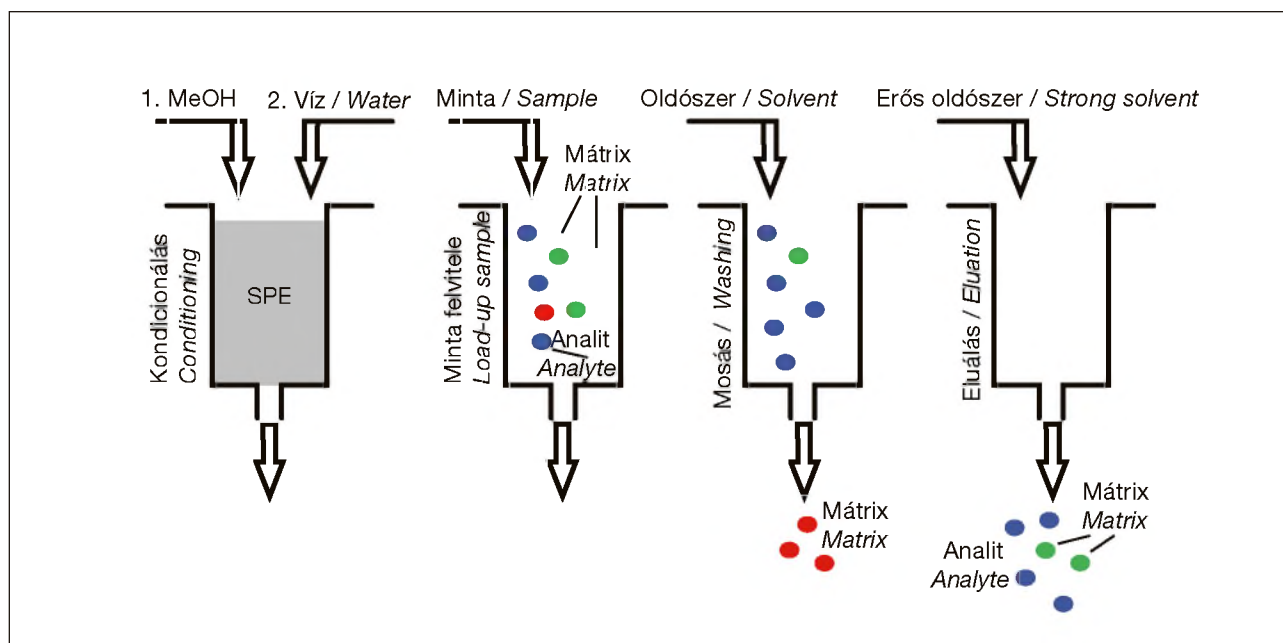
Az extraktumok tisztítására és dúsítására a leggyakrabban szilárd fázisú extrakciót (SPE) szokás alkalmazni. A szilárd fázisú extrakció a minta-előkészítés során alkalmazott kishatékonyságú folyadékkromatográfiás tisztítás. A minta-előkészítésben alkalmazott SPE lépések célja kettős: a minta tisztítása és a mérendő komponensek dúsítása. Az SPE oszlopok töltetei hasonlóak az analitikai célra alkalmazott kolonnák tölteteivel, így az SPE során egy oszlopkromatográfiás tisztítást végzünk. Az SPE töltetek osztályozása azonos a HPLC-kolonnák tölteteivel, az oldószererősség is közel azonos. Hidrofil módosított kopolimer SPE esetén például a metanol az acetonnitrilnél erősebb oldószer.

A mintatisztításhoz használatos SPE oszlopok töltetei:

- Poláris (normál fázisú) pl.: szilika gél, $-NH_2$,
- Apoláris (fordított fázisú) pl.: alkilmódosított szilika, polimer alapú fázis.
- Ioncserés (erős, gyenge ioncserélők, kevert módú).

A fordított fázisú töltetek közül leggyakrabban a C-18-as, illetve utó-szilanizált (end-capped) C-18-as tölteteket használnak, de a polimer alapú (pl.: sztírol-divinil-benzol) állófázisok alkalmazása is elterjedt, főképp az LC-MS/MS analízisek során [4]. A polimer alapú SPE oszlopok előnye, hogy pH 0-14-ig alkalmazhatók, a szilika alapú állófázisok alkalmazhatósági pH tartománya pedig szűkebb, 2-9 között van. Az LC-MS/MS módszerekben gyakori az olyan kopolimer SPE oszlopok használata, melyek töltetei az apoláris felület mellett poláris részeket is tartalmaznak (hidrofil módosított SPE). Visszatartásuk így a hidrofil és lipofil vegyületekre is megfelelő [5]. A kopolimer állófázis kialakításánál az apoláris divinilbenzol fázisba poláris N-vinilpirolidon csoportokat illesztnek be (1. ábra). Ezáltal egy olyan jól nedvesíthető töltet jön létre, amely a polárisabb molekulákat az N-vinilpirolidon csoportokon dipol – dipol kölcsönhatás és/vagy hidrogénhíd révén adszorbeálja, míg az apoláris vegyületek $\pi-\pi$ kötéssel vagy hidrofób kölcsönhatással kötődnek meg a fordított fázison.

Az SPE során a mintákat jól kondicionált oszlopokra visszük fel (2. ábra). A kondicionálás célja, hogy nedvesítsük a töltetet, eltávolítsuk a pórusokból a gyártás során visszamaradt technikai szennyezőket, illetve a levegőt. A kondicionálás során mindig erős szerves oldószerrel mossuk az oszlopot először, majd a leggyengébbel fejezzük be (vizes oldószer).



2. ábra. Az SPE tisztítás menete.
Figure 2. Process of SPE clean-up.

Fontos lehet, hogy a kondicionálás során utoljára használt oldószer pH-ja megegyezzen a mintaoldat pH-értékével. Az oszlopra felvitt minta oldószerének is a lehető leggyengébbnek kell lennie, hogy a komponensek szorpciója meginduljon az állófázis felé. Arra viszont ügyelni kell, hogy a minta oldószere még jól oldja a mintát, a komponensek ne váljanak ki az oszlopra öntés előtt. Fontos, hogy a minta áramlása lassú legyen az oszlopon, ugyanis a célkomponenseknek az oldószerből a szilárd felületre történő diffúziójához idő kell. A tölteten megkötődött komponensek mellől a mátrixvegyületeket az oszlop mosásával távolítjuk el (2. ábra). Itt is fontos, hogy a mosóoldat olyan gyenge oldószer legyen, amely nem indítja el a meghatározandó analitek elúcióját. A célkomponenseket az oszlop vákuummal történő szárítását követően valamely erős szerves oldószerrel (metanol, acetonitril, etilacetát) tudjuk eluálni. Úgy a mosóoldat, mint az eluáló oldószer erőssége, pH-ja fontos szerepet játszik van a mintatisztításában.

A szilárd fázisú extrakció során a mátrixalkotó vegyületek egy részét tudjuk csak eltávolítani a mintából. Azon mátrix vegyületek, melyek fizikai-kémiai tulajdonságaik hasonlóak a célvegyület fizikai-kémiai tulajdonságaihoz, azok együtt adszorbeálódnak, koncentráálódnak és eluálódnak a célkomponensekkel (2. ábra). Ezeket a mátrix komponenseket az LC-MS/MS analízis során választjuk el a célvegyületektől.

Az LC-MS/MS méréseknél gyakori az ún. „dilute and shoot” módszer alkalmazása a magasabb határértékű (>100 µg/kg) célkomponensek meghatározására. Ez a gyakorlatban annyit jelent, hogy a minta extrakcióját követően az extraktumot csak hígítjuk, és szűrést követően injektáljuk a készülékbe, mintatisztítási lépést (clean-up) nem alkalmazunk. Erre a célra azonban nagyérzékenységű készülékek alkalmazása szükséges, ha a célkomponensek határértéke alacsony (<1-10 µg/kg). Az a legjobb megoldás, ha a „dilute and shoot” módszert izotóphígítással kombináljuk, mert ilyen esetben a mátrixhatást az izotópjelzett belső standarddel kompenzálni lehet. A folyadékállapotú minták (pl.: vizelet, tej) esetén a szilárd folyadék extrakció nem alkalmazható, így a mintát nem lehet elválasztani az extraktumtól, ami nehezíti a

„dilute and shoot” módszer alkalmazását. Ráadásul a folyadékállapotú élelmiszerminták és testvialadékok esetén a határértékek akár egy-két nagyságrenddel is kisebbek lehetnek a szilárd állapotú élelmiszer mintákra megállapított határértékekhez képest, ennek következtében a folyadékállapotú minták dúsítása szükséges lehet az előkészítés során.

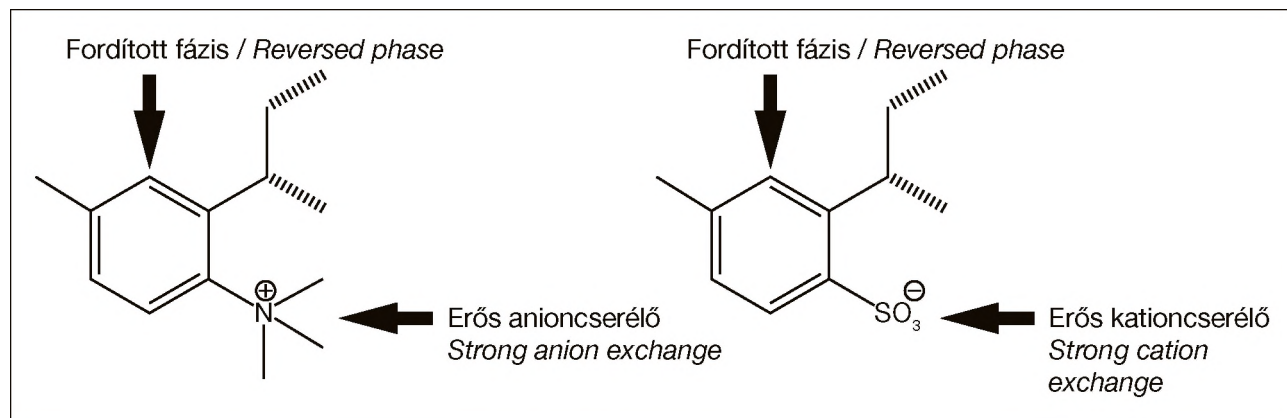
3.3. Polimer alapú kevert módú SPE oszlopok

A szilárd fázisú extrakció hatékonysága tovább növelhető, ha nem csak fordított fázist, hanem (erős vagy gyenge) ioncserélő csoportokat is tartalmaz az SPE oszlop töltete (3. ábra). Az így kialakított tölteteket tartalmazó SPE oszlopokat nevezük kevert módúaknak. Kevert módú SPE oszlopok használata esetén az extrakció során a hidrofíl oldallánccal módosított kopolimer SPE-töltetek nagyfokú visszatar-tása biztosítja a célkomponensek minimális veszteségét [5]. A célvegyületek mellett az SPE oszlopon a mátrixalkotók retenciója is nő, ami viszont növeli a mátrixhatást az LC-MS/MS analízisben. Így szükséges lehet komplex minták esetén (pl.: testvialadékok) olyan SPE alkalmazása, amely megfelelő szelektivitást biztosít a célvegyületek számára.

A polimer alapú kevert módú erős anioncserélő SPE oszlop (Mixed Anion eXchange - MAX) a fordított fázis mellett kvaterner-ammónium csoportokat is tartalmaz. A nem túl poláris neutrális és bázikus célvegyületek az SPE oszlop fordított fázisán adszorbeálódnak, míg a gyenge savas jellegű vegyületek a pH függvényében vagy az anioncserélő csoportokon vagy a fordított fázison. A kevert módú erős kationcserélő SPE oszlop (MCX) benzolszulfonsav csoportokat tartalmaz. A neutrális és savas vegyületek az MCX oszlop fordított fázisán kötődnek, míg a gyenge bázikus vegyületek az ioncserélő szulfonsav csoportokon vagy a fordított fázison tudnak adszorbeálódni a pH függvényében.

3.4. Kortikoszteroidok

A kortikoszteroidok az állatgyógyászatban gyakran és széles körben alkalmazott gyulladáscsökkentő szerek [6]. A leggyakrabban alkalmazott szintetikus



3. ábra. A kevert módú erős ioncserélő SPE oszlopok töltetei.
Figure 3. Mixed mode strong ion exchange SPE column packing.

kortikoszteroid tartalmú készítmények hatóanyagai a dexametazon, a prednizolon vagy a metilprednizolon, illetve ezek egyéb származékai (**1. táblázat**). Gyulladáscsökkentésre legálisan alkalmazhatóak a kortikoszteroidok, az állati eredetű élelmiszerekben maradáanyag tolerancia határértékkel (MRL) rendelkeznek [7], [8]. Tömegnövelő hatásuk miatt viszont a túlzott használatuk tiltott, ezért az élelmiszertermelő állatok vizelete nem tartalmazhat szintetikus kortikoszteroid szemaradékot. Az élelmiszeranalitika

során főképp a vágóhídi vagy az élőállattól származó vizeletmintákból történik a meghatározásuk. Vizeletmintákra az EU olyan koncentráció értéket ún. MRPL szintet (Minimum Required Performance Limit) határozott meg a célkomponensekre, melyet az adott analitikai módszerrel minimálisan tudni kell detektálni. A kortikoszteroidok közül csak a dexametazon (DXM) és a betametazon (BTM) rendelkezik MRPL értékkel, amely jelenleg 2 ng/mL [9].

1. táblázat: A szintetikus kortikoszteroidok szerkezete és az EU-ban hatályos MRL/MRPL értékük.
Table 1. Structure of synthetic corticosteroids and the value of MRL/MRPL forced in EU.

Kortikoszteroidok Corticosteroids	Rövidítés Abridgement	C6	C9	C11	C16	C16-17	C17	Állatfaj Species	Minta Sample	MRL (µg/ kg)	MRPL (ng/ mL)
Prednizolon	PRED			-OH			-OH	szarvasmarha cow	izom muscle	4	-
									máj, vese liver, kidney	10	-
									tej / milk	6	-
Prednizon	PREDON			=O			-OH	-	-	-	
Dexametazon	DXM			-F	-OH	-CH ₃ (α)	-OH	szarvasmarha, sertés, lófélék cow, pig, horse	izom muscle	0,75	-
									máj liver	2	-
									vese kidney	0,75	-
								szarvasmarha cow	tej / milk	0,3	-
								vizelet urine	-	2	
Betametazon	BTM			-F	-OH	-CH ₃ (β)	-OH	szarvasmarha, sertés, lófélék cow, pig, equines	izom muscle	0,75	-
									máj liver	2	-
									vese kidney	0,75	-
								szarvasmarha cow	tej / milk	0,3	-
								vizelet urine	-	2	
Metilprednizolon	METPRED	-CH ₃		-OH			-OH	szarvasmarha cow	izom, máj, vese muscle, liver, kidney	10	-
									tej / milk	2*	-
Metilprednizon	METPRE- DON	-CH ₃		=O			-OH	-	-	-	
Flumetazon	FLU	-F	-F	-OH	-CH ₃		-OH	-	-	-	
Triamkinolon	TRIAM		-F	-OH			-OH	-	-	-	
Triamkinolon acetonid	TRIAM-AC		-F	-OH		-O-C(CH ₃) ₂ -O-		-	-	-	

* Az MRL érték 2011-től érvényes [8]. / Value of MRL is valid from 2011 [8].

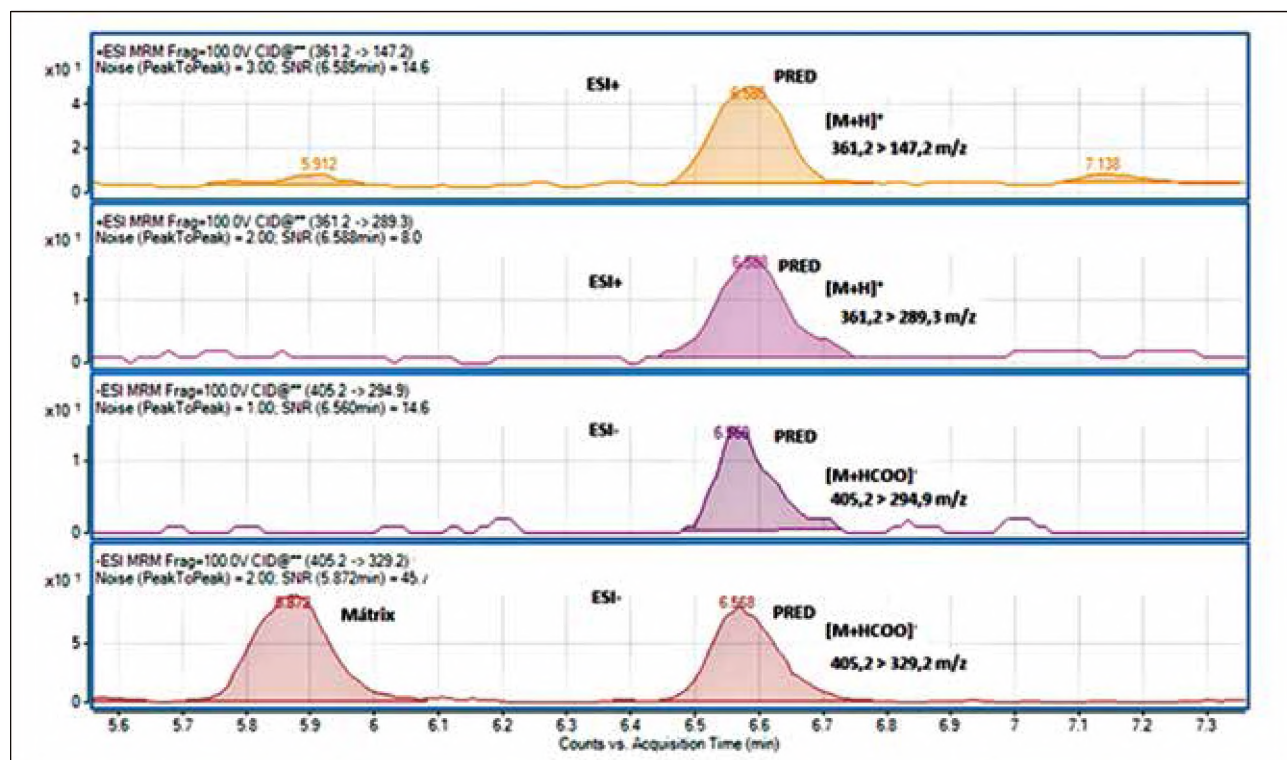
A kortikoszteroidok neutrális vegyületek, viszont a magas pH-n (>13) a szteránvázon levő hidroxil csoport(ok) disszociációja megindul, aminek következtében a kortikoszteroidok nagyon gyenge savas jellegre tesznek szert. A kortikoszteroidokat kromatográfiás szempontból a közepesen poláris (Log P = 0,32 – 2,31), neutrális vegyületek közé sorolhatjuk (**1. táblázat**). Fordított fázisú folyékkromatográfiás analízis során teljesen porózus és héjszerkezetű kolonnán is megfelelő retenció és csúcsszimmetria mellett választhatóak el. Tömegspektrometriás (MS) detektálás során pozitív és negatív ionizációs módokban is adnak prekursor iont (**4. ábra**) electrospray (ESI) és atmoszférikusnyomású kémiai ionizációs (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation - APCI) ionforrások alkalmazása esetén is jó hatásfokkal ionozálhatók. Pozitív módban protonált molekulaionként ($[M+H]^+$) mérhető, míg negatív polarizáció mellett formiát ($[M+HCOO]^-$) vagy acetát ($[M+CH_3COO]^-$) addukt anyaiionként a mozgófázis összetételétől függően [5], [10], [11], [12], [13] detektálhatók. A **4. ábra** a prednizolon ionátmeneteit mutatja pozitív és negatív ionizációs módokban acetonitril- 0,1% hangyasavat tartalmazó víz (v/v) eluens-összetétel mellett. A polarizációs módok változtatása lehetőséget biztosít a szelektivitás növeléséhez. Az 5,9 percnél eluálódó mátrixvegyület csak negatív ionizációs módban jelenik meg a kromatogramon. Ugyanakkor a pozitív ionizáció érzékenysége egy nagyságrenddel kisebb a negatív ionizációhoz képest. A polarizációs módok változtatása lehetőséget biztosít a szűrő (screening) és a megerősítő módszerek elválasztásához. Míg screening esetén pozitív módban kerülnek a kortikoszteroidok detektálásra, addig konfirmáció esetén negatív ionizációs módot lehet alkalmazni [13].

3.5. Stanozolol metabolitok

A stanozolol egy szintetikus szteroid, amely a tiltott hozamfokozók csoportjába tartozik. A stanozolol a szervezetben gyorsan metabolizálódik. Fő metabolitjai a 16-hidroxi-stanozolol (16-OH-STN), a 3'-hidroxil-stanozolol (3'-OH-STN) és a 4-hidroxi-stanozolol (4-OH-STN) (**5. ábra**), amelyek vizeletből mutathatók ki [14], [15]. A stanozolol metabolitok gyenge bázikus vegyületek (pKa 3,05 – 5,35), fordított fázisú LC elválasztás után pozitív módú ESI ionizáció mellett nagyérzékenységgel mérhető LC-MS-sel [15].

3.6. Mátrixhatás

A célkomponensekkel koeluálódó mátrixalkotók a célvegyületek ionizációját befolyásolják az ionforrásban. Elnyomják, esetleg felerősítik a mátrixvegyületek az analitek ionizációját. Nem csak a mátrixalkotók, hanem az együtt eluálódó célkomponensek is okozhatják egymás ionelnyomását. Hogy milyen irányban (elnyomás/erősítés) és milyen mértékben (%) változtatják meg a mátrixalkotók egy adott célvegyület ionizációját, azt abszolút mátrixhatás vizsgálatával tudjuk meghatározni [3]. Az abszolút mátrixhatás (Matrix Effect - ME%) a mátrixra illesztett és mátrix nélküli (tisztá oldószeres) kalibráció meredekségeinek összehasonlításával egyszerűen számítható. $ME(\%) = (a_{\text{mátrix}} / a_{\text{oldószer}} - 1) \times 100$, ahol 'a_{mátrix}' a mátrixra illesztett kalibráció meredeksége és 'a_{oldószer}' a mátrix nélküli kalibráció meredeksége. Amíg az ME (%) < 0 ionelnyomást mutat, addig az ME (%) > 0 ionerősítést jelent. Az abszolút mátrixhatás reprodukálhatósága adja a relatív mátrixhatás értékét [3]. A relatív mátrixhatás a mátrixra illesztett kalibrációk meredekségei-



4. ábra. A prednizolon MRM ionátmenetei pozitív és negatív ionizáció mellett.
Figure 4. MRM ion transitions of prednisolon by positive and negative ionisation.

nek szórásából számítható. Ez esetben 5 különböző eredetű, de azonos mintákból felvett kalibrációk meredekségeit kell meghatározni. Például 5 különböző szarvasmarhától származó vizeletről kell 5 kalibrációt készíteni, úgy hogy a vak vizeletek extraktumait adagoljuk adott koncentrációs szintekre és ezekből a mintákból vesszük fel az öt kalibrációt. A kalibrációk meredekségeinek relatív szórása (RSD%) adja a relatív mátrixhatás értékét [3]. Meghatározható a relatív mátrixhatás egy adott koncentrációs szinten is, például a célkomponens határértékén. Ilyenkor vakminták (öt különböző szarvasmarha vizelet) extraktumait adagoljuk a minta-előkészítést követően a határértéknek megfelelő koncentrációra.

Analizáljuk a mintákat és a kromatográfiai csúcsterületek relatív szórásaként (RSD%) adjuk meg a relatív mátrixhatás értékét az adott koncentrációs szinten. A mátrixhatás reprodukálhatóságának vizsgálata azért is fontos, mert a mérések során mátrixra illesztett kalibrációval kompenzáljuk a tesztmintákban levő mátrixhatást. Ha a mátrixhatás jól reprodukálható, akkor a tesztmintában és a kalibrációs mintában közel azonos értékű mátrixhatás éri a célkomponenseket, ezáltal a mátrixhatás jól kompenzálható lesz.

A mátrixhatás kompenzálására alkalmazhatunk izotóphígítást is. Ilyenkor a tesztmintát a célvegyület stabil izotópjelzett analógjával, mint belső standarddal (Internal Standard - ISTD) adagoljuk. A célkomponens és az ISTD koelúciója következtében ugyanaz

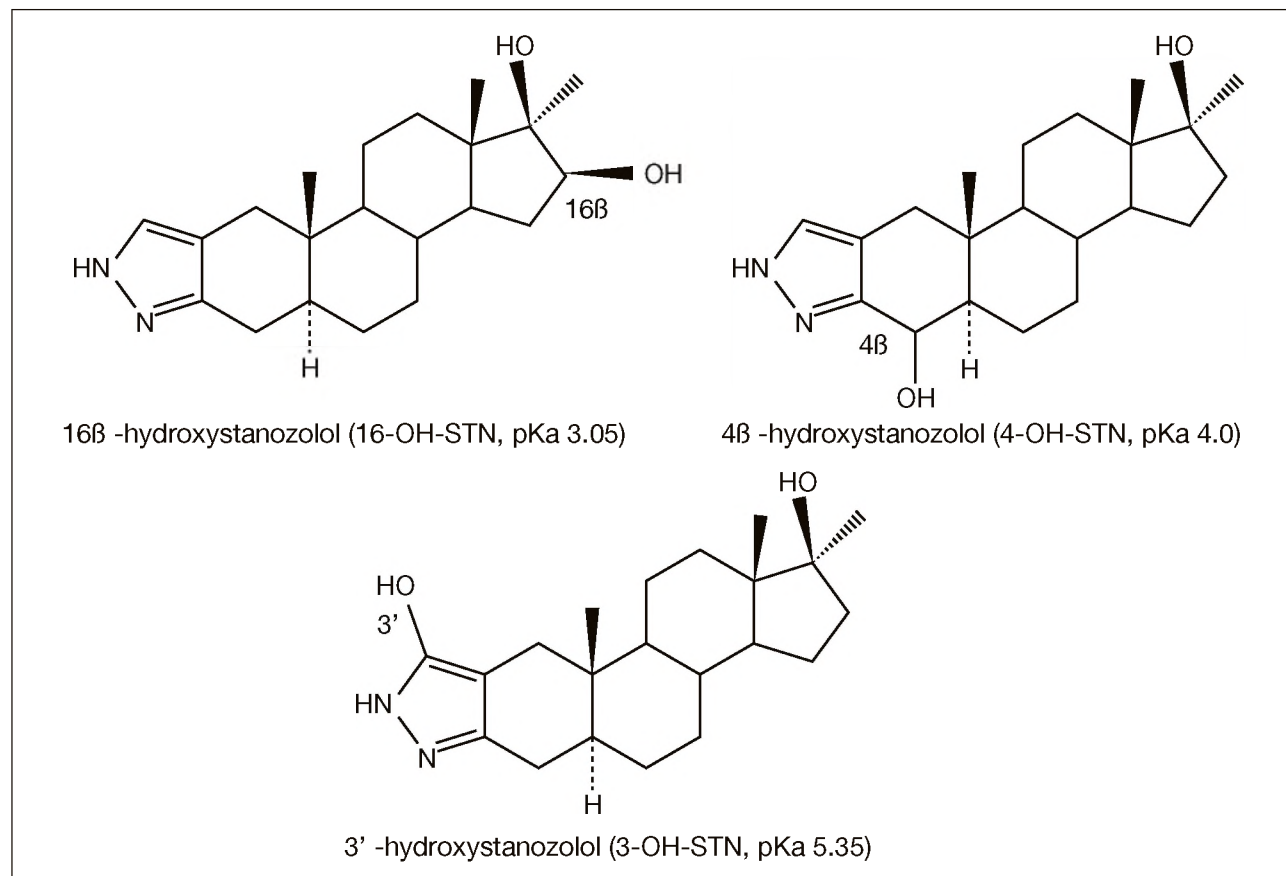
a mátrixhatás éri a jelületlen és az analóg jelölt vegyületet is, így a válaszjelek (kromatográfiai csúcsterületük) aránya, az izotóparány, a mátrixhatástól független lesz.

4. Vizeletminták előkészítése LC-MS/MS analízishez

Vizeletminták elemzése során mindig számolni kell a gyenge savas (pKa 3-7) mátrixalkotók jelenlétével, amelyek döntően befolyásolják az analízis kimenetelét [12]. A gyenge savas mátrixok protonfunkcióját kihasználva az elválasztásuk neutrális és bázikus vegyületektől erős anioncserélő SPE oszlopokon valósítható meg.

4.1. Kortikoszteroidok

A neutrális kortikoszteroidoktól kevert módú erős anioncserélő SPE és lúgos pH kontroll alkalmazásával a gyenge savas mátrixok könnyen elválaszthatók [12]. A gyenge savas komponensek lúgos pH-n ionos kölcsönhatás révén kötődnek a kevert módú erős anioncserélő (MAX) SPE oszlop kvaterner ammónium csoportjaihoz, a neutrális célvegyületek pedig az SPE fordított fázisán adszorbeálódnak. Neutrális elúciót alkalmazva (pl.: acetonitrillel, diklórméttánnal) a savas vegyületek továbbra is ionos kölcsönhatás révén kötődnek meg az SPE oszlopon, a neutrális kortikoszteroidok ugyanakkor eluálódnak, ilyen módon szelektív extrakciós lépés valósítható meg.



5. ábra. A stanoszolol metabolitok szerkezete [15].
Figure 5. Structure of stanosolol metabolits [15].

A gyenge savas mátrixok eltávolítása azért is fontos, mert a kortikoszteroidok acetát $[M+CH_3COO]^-$ vagy formiát $[M+HCOO]^-$ adduktként adnak negatív módban érzékeny anyaiónt. A gyenge savas mátrixalkotók szintén negatív módban ionizálódnak jól és így a kortikoszteroidok ionelnyomását okozhatják koelúció esetén.

A szilárdfázisú extrakció során fontos a pH megválasztása, ugyanis ha a gyenge savas mátrixalkotók nem teljesen disszociált állapotban vannak, akkor a gyenge savas mátrixkomponensek is az SPE oszlop fordított fázisán fognak adszorbeálódni, majd együtt eluálódnak a célvegyületekkel.

A **2. táblázat** a kortikoszteroidok LC-MS/MS módszerű analízise során tapasztalt mátrixhatás ismételtetését mutatja vizeletmintákban különböző pH-jú SPE tisztítás után [12]. Hat különböző, szarvasmarha-vizeletből készített vakmintát készítettünk elő kevert módú erős anioncserélő SPE oszlopokon. A mintatisztítást két különböző pH-érték beállítása mellett végeztük. Az első körben a hat vizeletmintát 5,2-es pH-n készítettük elő, majd egy újabb bemérést követően már lúgos 9-9,5-es pH-n tisztítottuk meg ugyanazt a hat vizeletet. A mintákat vizes mosás után tiszta acetonitrillel és ezt követően még diklórmétánnal eluáltuk az SPE oszlopokról. A szárazra párolást követően 6 kortikoszteroid komponenssel 2 ng/mL-es koncentráció szintre adagoltuk a mintákat, amelyeket és 50% metanolban oldottunk vissza. A mintákat LC-MS/MS módszerrel analizálva a csúc alatti területeket komponensenként hasonlítottuk össze. A mátrixhatást a kromatográfiás csúcsterületek relatív szórásaként értékeltük 2 ng/mL-es szinten. A **2. táblázatból** jól látható, hogy savas pH-n a mátrixhatás ismételtetésége alacsony (21% - 43,1%), ezzel szemben lúgos pH-n számottevően jobb az ismételtetés (2,8% - 5,7%). Ez azzal magyarázható, hogy savas 5,2-es pH-n a gyenge savas komponensek nem képesek szelektív módon ionos kölcsönhatás révén kötődni az ioncserélő csoportokhoz így a fordított fázison együtt koncentráálódtak a kortikoszteroidokkal.

A szelektív extrakció ugyanakkor lúgos pH-n jól működött, mert a gyenge savas mátrixalkotók teljesen disszociált állapotban ionos kölcsönhatással kapcsol-

lódtak az SPE oszlop töltetéhez. Neutrális elúciót alkalmazva csak a fordított fázison adszorbeált komponensek eluálódtak, így a gyenge savas mátrixok elválasztása a neutrális kortikoszteroidoktól ezzel a lépéssel kivitelezhető volt [12].

Az optimalizált módszert nemzetközi körvizsgálatban alkalmaztuk metilprednizonon (METPRED) és metilprednizon (METPREDON) szarvasmarha-vizeletből történő meghatározására. A feladat a metilprednizonon, annak metabolitja, a metilprednizon meghatározása volt négy (**A**, **B**, **C** és **D**) vizeletmintából. Az **A** és **B** mintában csak metilprednizonon volt mérhető 0,12 – 0,67 ng/mL koncentrációban. A **C** minta vak volt (<0,05 ng/mL), a **D** mintában a metilprednizon volt detektálható 0,84 ng/mL koncentrációban. A **D** minta metilprednizonon is tartalmazott, de annak értékelését nem kérte a szervező laboratórium (EU-RL Rikilt, Wageningen, Hollandia). A detektált X,XX ng/mL alatti koncentrációk mind a négy minta esetén megfelelőek voltak (**3. táblázat**), így az eljárás alkalmazhatósága teljes körűen sikerült igazolnunk [12]. A körvizsgálat eredményét abban az esetben tekintették megfelelőnek, ha az egyes Z-értékek -2 és 2 közötti tartományba estek.

4.2. Stanozolol metabolitok

A stanozolol metabolitok (**5. ábra**) gyenge bázikus vegyületek (pK_a 3,05 – 5,35), így savas pH-n ($pH < pK_a - 2$) jól kötődnek a kevert módú kationcserélő SPE oszlop (MCX) szulfonsav csoportjaihoz ionos kölcsönhatás révén. A minta pH-ját 1-re állítva a metabolitok szelektív extrakciója jól kivitelezhető kevert módú kationcserélő SPE-n. A savas és neutrális mátrixalkotók az MCX SPE oszlop fordított fázisú felületén kötődnek meg, és a bázikus célvegyületektől neutrális szerves oldószerrel történő mosással választatók el. 1-nél magasabb pH alkalmazása nem lehetséges, mert a kevésbé savas közegben nem valósulna meg a metabolitok szelektív kötődése az SPE oszlop kationcserélő csoportjaihoz, mivel csak részben lennének ionos állapotban. A metabolitokat bázikus szerves oldószerrel (ammónia tartalmú metanol vagy acetonitril) lehet a kationcserélő SPE oszlopról eluálni. A vonatkozó visszanyerések a vizelet-mátrixban 10% – 71% között változtak [15].

2. táblázat: A relatív mátrixhatás értéke vizeletben különböző pH-jú MAX SPE tisztítást követően.
Table 2. Value of relative matrix-effect after MAX SPE clean-up in urine samples with different pH.

Kortikoszteroidok Corticosteroids	SPE (pH – 5.2)	SPE (pH – 9-9.5)
	RSD% (n=6)	RSD% (n=6)
PRED	33.6	4.8
DXM	31.1	3.2
METPRED	43.1	5.7
FLU	38.2	5.2
TRIAM-AC	40.2	2.8
TRIAM	21.0	4.9

Az alacsony visszanyerés oka az, hogy 1-es pH-n a mintában levő, valamennyi bázikus mátrixvegyület a kationcserélő csoportokon kötődnek, így a bázikus mátrix komponensek együtt koncentrálnak a metabolitokkal a kationcserélő csoportokon. A bázikus mátrixvegyületek egyrészt zavarják a metabolitok kötődését a szulfonsav csoportokhoz alacsony pH-n, másfelől a HPLC elválasztás során koelúció esetén befolyásolják a metabolitok ionizációját, ami az alacsony visszanyerési értékeket eredményezheti.

Kevert módú erős anioncserélőt (MAX) alkalmazva 10-es pH-n a metabolitok a fordított fázison adszorbeálódnak, míg a savas mátrixalkotók ismét ionos kölcsönhatás révén az ioncserélő csoportokon. A bázikus mátrixalkotók a polaritásuktól függően a fordított fázisú felületen tudnak kötődni, visszatartásuk kisebb, mint az MCX oszlopon savas pH mellett. Dietiléteres eluálás után a metabolitok visszanyerése vizeletmintákban 78% – 97% [15]. Annak ellenére, hogy a stanazolol metabolitok bázikus vegyületek, a tisztítási és dúsítási módszer MAX SPE oszloppal jobbnak bizonyult, mint MCX oszloppal.

A módszer alkalmazhatóságát kontrollminták mérésével igazoltuk. Kísérleteink során stanazolollal kezelt szarvasmarhák vizeleiből (2 mintából) a főmetabolitot, a 16-OH-STN-t kellett meghatározni. A detektált koncentrációk 0,99 ng/mL és 2,83 ng/mL-nek adódtak. A mintákhoz hozzárendelt értékek 0,90 ± 0,53 ng/mL és 2,20 ± 1,22 ng/mL volt. A módszer pontossága kezelt állatoktól származó vizelet minták elemzése esetén is megfelelő [15].

5. Tejminták előkészítése LC-MS/MS analízishez

Tejminták analízise során is számolni kell a protonfunkciós mátrixalkotók jelenlétével. Ezek főként ikerionos vegyületek: aminosavak, peptidek és fehérjék. Így mind a savas, mind a lúgos pH-kontroll alkalmazását meg kell vizsgálni és ennek megfelelően megválasztani a módszerben alkalmazandó kevert módú SPE oszlopot. Kortikoszteroidok tejből történő meghatározásánál kevert módú erős anioncserélő és kevert módú erős kationcserélő SPE oszlopokat próbáltunk ki különböző pH-értékeken. A MAX oszlopon az adagolt (0,3 – 6 µg/kg) tejmintákat (n = 3) 11-es pH-n tisztítottuk. Az MCX oszlopon pedig 2,3-as pH beállítás mellett dolgoztunk. A mintákat acetonnal eluálva a visszanyerések (6. ábra) az MCX oszlopon 94% – 113%-nak adódtak, amelyek magasabb értékek, mint a MAX SPE oszlopon történő előkészítés után detektált visszanyerési adatok (56% – 73%) [16]. Az MCX oszlopon történő tisztítást más eluálószerrel is kiprobáltuk. Diklórmetánnal (DCM) eluálva a mintát a visszanyerések 43% és 97% között változtak a szteroidokra. Mikor acetonitrilt és még diklórmetánt (ACN +DCM) is alkalmaztunk eluálásra, a visszanyerések javultak, 58% és 89% közöttiek voltak (7. ábra), de az acetonos eluálással elért visszanyerési értékeket nem értük el [16]. A példa jól mutatja, hogy a kevert módú SPE esetén is fontos az eluáló oldószer megválasztása a megfelelő analitikai teljesítményjellemzők eléréséhez. A pH-optimalt SPE után lényegesen csökkent a mátrixhatás az LC-MS/MS analízis során, ami lehetővé tette a tejminták nagyarányú dúsítását és vele együtt a

3. táblázat: Körvizsgálati eredmények.
Table 3. Results of ring test.

Minta Sample	Detektált komponens Detected components	Mért értékek (ng/mL) Measured values (ng/mL)	EU-RL értékei (ng/mL) EU-RL values (ng/mL)	Z-érték Z-values	Értékelés Evaluation
A	METPRED	0,67	0,71	0,14	Megfelelő / Satisfactory
B	METPRED	0,12	0,11	-0,44	Megfelelő / Satisfactory
C	-	< LOD	< LOD	-	Megfelelő / Satisfactory
D	METPREDON	0,84	0,71	-0,06	Megfelelő / Satisfactory

4. táblázat: Kortikoszteroidok kimutatási határai tejben különböző ionizációs technikák mellett.
Table 4. Detection limits of corticosteroids from milk samples using different ionisation technics.

Kortikoszteroidok / Corticosteroids	MMI ionforrás APCI módban MMI ion source with APCI mode	Módosított ESI ionforrás Modified ESI ion source
	LOD (ng/kg)	LOD (ng/kg)
PRED	60	2
METPREDON	60	3
DXM	20	1
FLU	20	1
METPRED	70	6

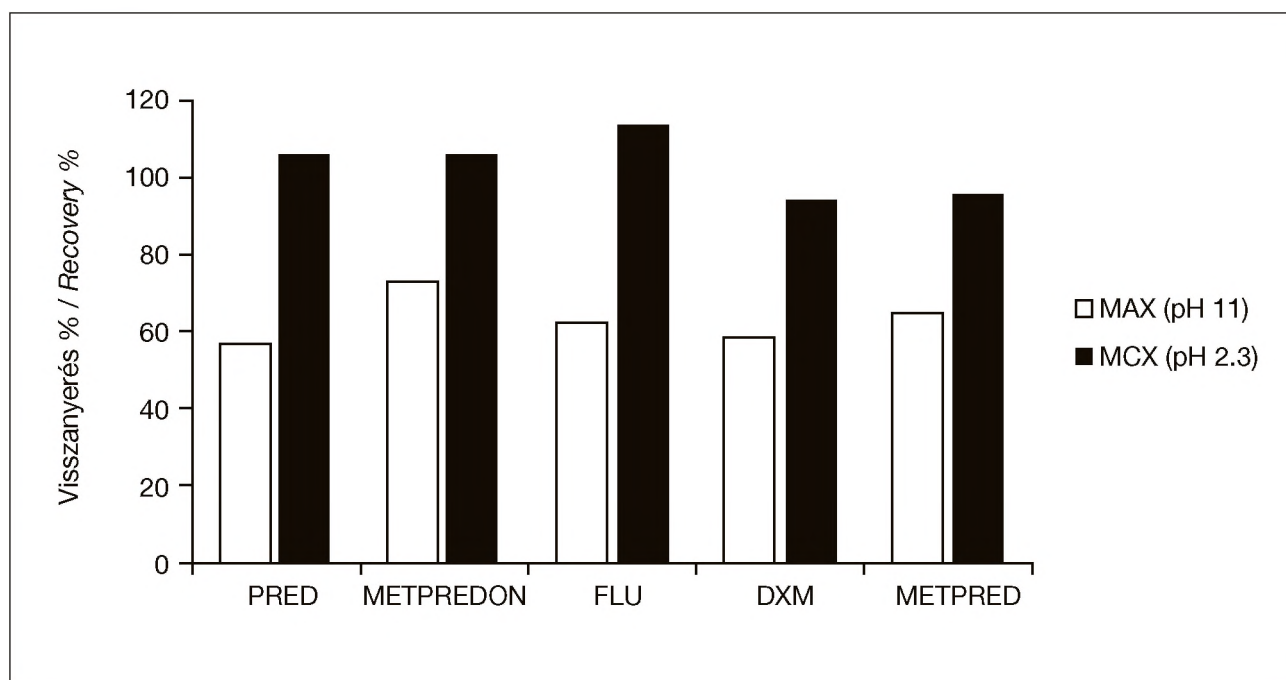
kimutatási határok (LOD) ng/kg szintre történő csökkentését (4. táblázat). Módosított ESI ionforrással az LOD értékek még alacsonyabbnak adódtak (1 – 6 ng/kg), mint az APCI módban működő multimód (MMI) ionforrással elérhető LOD-k (20-70 ng/kg) [16].

6. Állati szövetminták előkészítése LC-MS/MS analízishez

Az előző módszerek jól demonstrálták a polimer alapú SPE oszlopok visszatartását kortikoszteroidokra. Így a szövetminták (szarvasmarha izom, máj és vese) esetén az SPE optimalálásánál már csak a mátrixhatások vizsgálatára helyeztük a hangsúlyt, mert a szövetmátrix lényegesen eltérő a korábban vizsgált mintáktól (tej, vizelet). Három különböző pH-beállítás (savas, neutrális és bázikus) mellett extraháltuk a szövetmintákat, a pH-kontrollt a szilárd folyadék extrakció során is megtartva. Savas (i) extrakciót követően a mintákat 2,3-as pH-n MCX SPE oszlopon készítettük elő. A kopolimer SPE oszlopot neutrális (ii) 7-es pH-n alkalmaztuk, míg bázikus (iii) 11-es pH-n a MAX SPE oszlopot próbáltuk ki [17]. Savas pH-kontroll mellett a kortikoszteroidokra a három szövetminta esetén az abszolút mátrixhatás számértéke -30,2% és +15,0% között változott. A relatív mátrixhatás értéke 0,7% és 10,7% között volt. Hetes pH-n történő előkészítés során az ionnyomás mértéke (-68,4% és -18,5%) magasabb volt (főként izom minták esetén), mint savas pH-n. A mátrixhatás reprodukálhatósága is alacsonyabbnak adódott (4,0% és 11,2%) az MCX SPE előkészítéshez képest. Ez annak a következménye, hogy a kopolimer SPE oszloptöltet nem rendelkezik azzal a kellő szelektivitással, amelyet a kevert módú MCX SPE töltet savas pH-kontroll mellett garantál [17].

Annak érdekében, hogy teljes mértékben meggyőződjünk a pH szerepéről a minta-előkészítésben, a mátrixhatást bázikus pH-kontroll mellett is kiértékeljük a mind a 3 szövetmintában. Az abszolút mátrixhatás -44,4% és -4,1% közötti értékek adódtak MAX SPE oszlop használata után. A mátrixhatás reprodukálhatósága pedig 6,5% és 12,9% között változott. Mind a három szövetmintán esetén a kevert módú MCX vagy MAX SPE oszlop alkalmazása volt az előnyösebb a hidrophil módosított kopolimer SPE oszlophoz képest. Izomminták esetén az MCX SPE eredményezte a legalacsonyabb mátrixhatásokat, míg vese esetén a MAX SPE oszlop használata bizonyult kedvezőbbnek. Máj esetén nem volt lényeges különbség az MCX és a MAX SPE oszlopok között a mátrixhatások tekintetében [17]. Tapasztalataink az is jól szemléltetik, hogy a különböző mátrixú szövetminták esetén az LC-MS/MS mérés mátrixhatása miképp változik.

A módszer további előnye a kortikoszteroid epimerrek, a dexametazon (DXM) és a betametazon (BTM) egymástól való elválasztása. A két epimer a szteránváz 16-os szénatomján levő metil-csoport térállásában különbözik (1. táblázat), így az alapvonalig történő elválasztásukhoz megfelelő szelektivitású HPLC oszlop alkalmazása szükséges. A minél nagyobb kromatográfiás felbontás a két epimer között azért fontos, mert a DXM és a BTM ionátmenetei megegyeznek és így az MS/MS detektor nem képes külön tömegcsatornán érzékelni a két kortikoszteroidot. A két epimer között izokratikus elválasztással metanol/(5 mM ammónium acetát) és 0,01% ecetsav vízben (50/50, pH 5,4) összetételű mozgófázissal héjszerkezetű fenil-hexil oszloppal 1,05-ös szelektivitási faktor érhető el (8. ábra) [17].

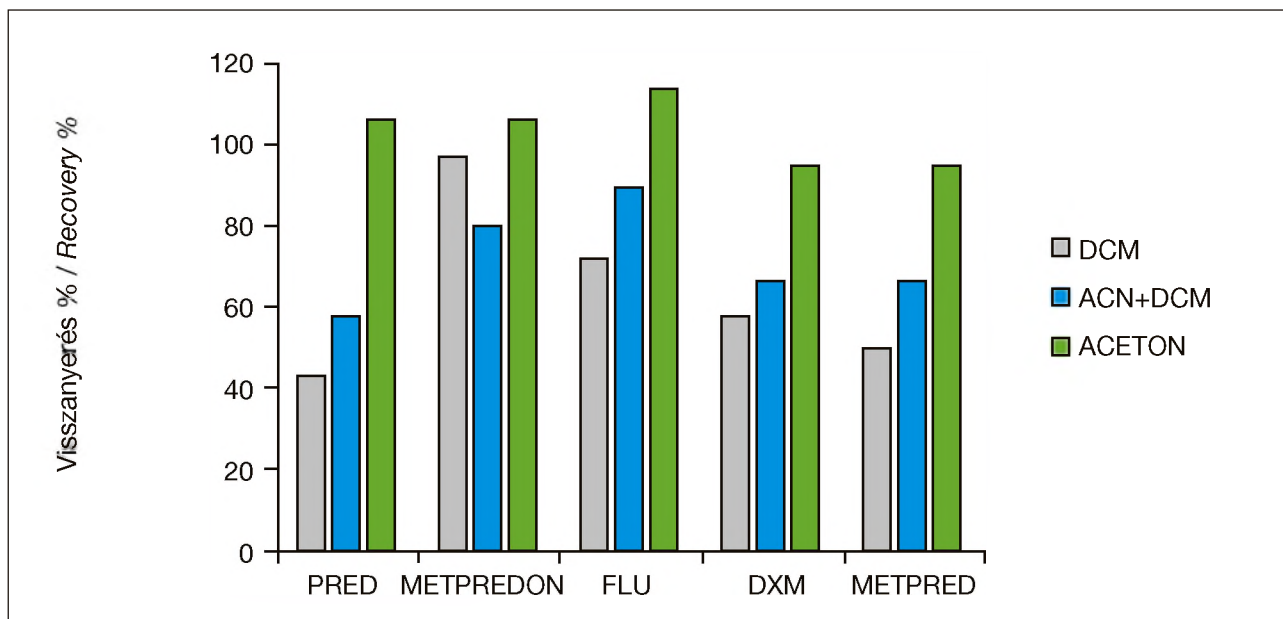


6. ábra. Kortikoszteroidok visszanyerése kevert módú SPE oszlopokon acetonos eluálás mellett.
Figure 6. Recovery of corticosteroids using mix-mode SPE column packing with acetone elution.

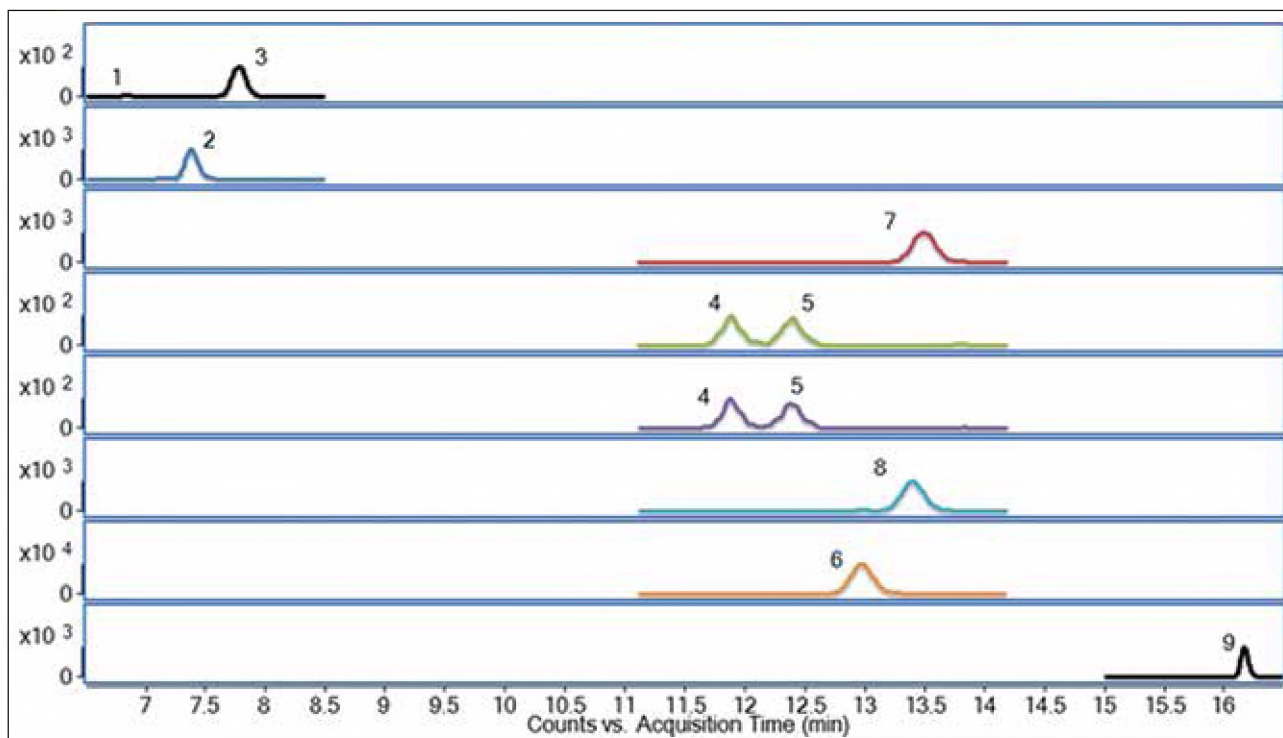
A fenti leírás alapján kidolgozott LC-MS/MS-módszerrel egy kontroll mintát is elemeztünk, az eljárás pontosságának igazolása végett. A minta természetes szennyezésként dexametazont tartalmazott. Három független analízis eredményeként a detektált dexametazon koncentrációk rendre 1,63 µg/kg, 1,58 µg/kg és 2,18 µg/kg értékűnek adódtak. Átlagértékük $1,78 \pm 0,35$ µg/kg volt. A kontrollminta tanúsítványa szerint a koncentrációk 0,85 és 5,97 µg/kg tartományban elfogadhatók, tehát a módszer pontosságát kezelt állattól származó mintában is sikerült igazolni [17].

7. Kevert módú vs. hidrofil módosított kopolimer SPE

Előbbi példánkban a szimultán meghatározandó célvegyületek kromatográfiás szempontból azonos csoportba tartoztak. Valamennyi kortikoszteroid nagyon gyengén savas, inkább neutrális vegyület. A stanazolol metabolitok gyenge bázikus jellegűek. Amikor neutrális és protonfunkciós célkomponenseket kell együtt meghatározni (pl.: *Alternaria* toxinok), nem biztos, hogy a kevert módú SPE nyújtotta selektivitás kihasználható. Az *Alternaria* toxinok gyenge



7. ábra. Kortikoszteroidok visszanyerése MCX SPE oszlopon különböző eluálás mellett.
Figure 7. Recovery of corticosteroids in MCX SPE with different eluents.



8. ábra. Kortikoszteroidok elválasztása héjszerkezetű fenil-hexil HPLC oszlopon. A komponensek: 1. mátrix csúcs; 2. PREDON; 3. PRED; 4. DXM; 5. BTM; 6. METPREDON; 7. METPRED; 8. FLU; 9. TRIAM-AC.
Figure 8. Separation of corticosteroids. Components: 1. matrix peak; 2. PREDON; 3. PRED; 4. DXM; 5. BTM; 6. METPREDON; 7. METPRED; 8. FLU; 9. TRIAM-AC.

savas vegyületek, kivéve a tentoxint, amelynek molekulája neutrális. Így kevert módú anioncserélő SPE oszlopon a tentoxin nem képes az anioncserélő csoportokon kötődni. Kevert módú kationcserélőn savas pH-n a toxinok a fordított fázisú felületen adszorbeálódnak és a bázikus jellegű mátrixok így könnyen eltávolíthatók a mintából. Ennek ellenére a toxinokat az MCX SPE oszloptölteten végzett tisztítás után is magas mátrixhatás éri az LC-MS/MS mérés során, amiből arra lehet következtetni, hogy a neutrális vagy gyenge savas jellegű mátrixalkotók okozzák az *Alternaria* toxinok ionelnyomását az ionforrásban [18]. Ez esetben, amikor eltérő fizikai-kémiai tulajdonságú (savas és neutrális) vegyületeket kell egymás mellett meghatározni, a kevert módú SPE oszloptöltet biztosította előnyök nem használhatóak ki, helyette és a hidrofil módosított kopolimer SPE töltet alkalmazása a megfelelőbb.

8. Következtetések

Az LC-MS/MS technikán alapuló módszerek megbízhatósága jelentősen függ a minta-előkészítésének módjától. A tisztítási lépések célja, hogy a célkomponensekkel koeluálódnak, de a detektor számára láthatatlan, mátrixalkotók koncentrációját minimalizáljuk. A hagyományos fordított fázisú szilárd fázisú extrakció során a célvegyületekkel azonos polaritású mátrixkomponensek együtt koncentrálnak az analitokkal. Amennyiben a folyadékkromatográfiás elválasztással nem sikerül megfelelő felbontást elérni a mátrixalkotók és a célkomponensek között, akkor feltehető, hogy a mátrix az analit ionizációját befolyásolhatja az ionforrásban. Ezért szükséges lehet olyan SPE oszlopok alkalmazása, amelyek szelektív kötőhelyeket biztosítanak a célvegyületeknek és a mátrixkomponenseknek is. A kevert módú SPE oszlopok az ioncserélő csoportok révén teszik lehetővé még a legösszetettebb minták (pl.: vizelet) nagymértékű tisztítását is a célvegyületek minimális vesztesége mellett.

9. Irodalom

- [1] Az alapjogok általános kérdései. http://www.wesley.hu/files/Az_alapjogok_altalanos_kerdesei.doc (Hozzáférés: 2016. 04. 12.)
- [2] Vidékfejlesztési Minisztérium- 10/2002. (I.23.) FVM rendelete. <http://www.fvm.hu/main.php?folderID=1978&articleID=4623&ctag=articlelist&iid=1> (Hozzáférés: 2016. 04. 12.)
- [3] Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (2003): Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75. p. 3019–3030
- [4] Tölgyesi, Á., Sharma, V.K., Fekete, S., Fekete, J., Simon, A., Farkas, S. (2012): Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 64-65. p. 40-48

- [5] Tölgyesi, Á., Verebey, Z., Sharma, V. K., Kovacsics, L., Fekete, J. (2010): Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 78. p. 972-979
- [6] Törzskönyvezett állatgyógyászati szerek. http://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/allatgyogyaszati_igazgatóság/kozerdeku/torzskonyvezes/forgalmazhato/nemzeti (Hozzáférés: 2016. 04. 14.)
- [7] Commission Regulation (EU) 37/2010, Off. J. EU. Legis (2010) L 15/1.
- [8] Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use on the establishment of maximum residue limits. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum-residue-limit_opinion/2012/03/WC500124459.pdf (Hozzáférés: 2016. 04. 14.)
- [9] CRL Guidance Paper: CRLs view on State of the art analytical methods for national residue control plans, RIVM-NL (2007). http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/EURL_Empfehlungen_Konzentrationsauswahl_Methodenvalidierungen.pdf?blob=publicationFile (Hozzáférés: 2016. 04. 11.)
- [10] CRL RIVM The Neatherlands, Analysis of corticosteroids in bovine urine using LC-MS/MS. (2009) http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaldepot/SOP%20ARO_517.pdf (Hozzáférés: 2016. 04. 13.)
- [11] Andersen, J. H., Hansen, L.G., Pedersen, M. (2008): Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantitative determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 617. p. 216-224
- [12] Tölgyesi, Á., Kovacsics, L., Sharma, V.K., Fekete, J. (2010): Quantification of corticosteroids in bovine urine using selective solid phase extraction and reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 878. p. 1471-1479
- [13] Tölgyesi, Á., Bartha, E., Giri, A., Simon, A., Sharma, V.K. (2017): Determination of veterinary drugs in urine, blood and food matrices using simplified liquid extraction and solid phase extraction: liquid chromatography tandem mass spectrometric methods for screening and confirmation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *Közlemény készítés alatt.*
- [14] De Brabander, H.F. et al. (1998): Multilaboratory study of the analysis and kinetics of stanozolol and its metabolites in treated calves. *Analyst* 123. p. 2599–2604
- [15] Tölgyesi, Á., Sharma, V.K., Fekete, J. (2014): Confirmatory analysis of stanozolol metabolites

tes in bovine, pig and sheep urines using an optimized clean-up and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88. p. 45–52

[16] Tölgyesi, Á., Tölgyesi, L., Sharma, V.K., Sohn, M., Fekete, J. (2010) : Quantitative determination of corticosteroids in bovine milk using mixed-mode polymeric strong cation exchange solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53. p. 919-928

[17] Tölgyesi, Á., Sharma, V.K., Fekete, S., Lukonics, D., Fekete, J. (2012) : Simultaneous determination of eight corticosteroids in bovine tissues using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 906. p. 75-84

[18] Tölgyesi, Á., Stroka, J., Tamosiunas, V., Zwickel, T. (2015): Simultaneous analysis of *Alternaria* toxins and citrinin in tomato: an optimized method using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 32. p. 1512-1522.



A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Shutterstock