

Lech Rodziewicz

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI CHLORAMFENIKOLU W MOCZU BYDŁA Z ZASTOSOWANIEM POLIMERÓW Z ODWZOROWANIEM CZĄSTECZKOWYM METODĄ LC-MS/MS

Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych
Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Białymstoku
Kierownik: dr *L. Rodziewicz*

Przedstawiono metodę wykrywania i ilościowego oznaczania pozostałości chloramfenikolu w moczu bydła. Próbkę była oczyszczana przy zastosowaniu polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym (MIP). Analizę przeprowadzono w układzie LC-MS/MS z zastosowaniem kolumny Luna C18 Phenomenex. Jako standard wewnętrzny zastosowano CAP-d5. Metodę zwalidowano zgodnie z kryteriami Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Średni odzysk próbek wzmocnionych był powyżej 86%. Limit decyzyjny (CCa) i zdolność wykrywania (CCβ) wynosiły odpowiednio 0,07 µg/kg i 0,09 µg/kg.

Hasła kluczowe: chloramfenikol, polimery z odwzorowaniem cząsteczkowym, pozostałości, mocz, LC-MS/MS.

Key words: chloramphenicol, molecularly imprinted polymers, residues, urine, LC-MS/MS.

Chloramfenikol (CAP) jest jednym z najstarszych antybiotyków o szerokim zakresie działania bakteriostatycznego. Hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz wirusów. Obok cennego działania farmakologicznego CAP może powodować występowanie niezwykle groźnej dla życia ludzi niedokrwistość plastycznej. Z tego powodu uznano, że pozostałość CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego może stanowić zagrożenie dla człowieka. Wprowadzono zakaz stosowania go u zwierząt, których produkty przeznaczone są do spożycia. Mimo to istnieją podejrzenia, że CAP może być wykorzystane przez nieuczciwych hodowców co spowodowało, że związek ten został włączony do programu badań kontrolnych.

Określone zostało tymczasowe minimalne wymaganie wartości granicznej wydajności metod analitycznych MRPL (ang. minimum required performance limit) stosowanych do oznaczania CAP dla mięsa, jaj, mleka, owoców morza (krewetki, kraby), miodu i moczu, które wynosi 0,3 µg/kg (1).

Mało jest prac dotyczących oznaczania CAP metodą LC-MS/MS w moczu zwierząt (2, 3, 4). Procedura przygotowania próbek moczu do MS polega przeważnie na oczyszczaniu ich poprzez bezpośrednie nanoszenie próbki moczu na kolumnienki C18 (4) lub Chem Elut (2, 3) i ekstrakcji octanem etylu.

Wśród nowych technik stosowanych do oczyszczania próbek na uwagę zasługuje metoda ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentów z nadrukiem molekularnym (ang. Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction – MISPE). Ten rodzaj sorbentów polimery z nadrukiem molekularnym (ang. Molecularly Imprinted Polymers – MIP) określane są często mianem sztucznych przeciwciał z uwagi na dużą selektywność sorbentu w stosunku do określonych analitów podobnie, jak ma to miejsce w przypadku immunosorbentów.

Zasada tworzenia MIP polega na obudowaniu cząsteczki wzorca polimerami oddając w ten sposób jej wielkość i kształt. Powstaje kompleks monomer-cząsteczka wzorca, która zostaje unieruchomiona w sieci polimerycznej. Z chwilą usunięcia cząstek wzorca z matrycy, powstają wolne przestrzenie, które dopasowane są do oznaczanej substancji rozmiarem, kształtem oraz właściwościami. Dzięki temu stają się one dostępne jedynie dla cząsteczek podobnych lub wręcz identycznych ze wzorcem. Grupy funkcyjne odcisków molekularnych stanowią zatem kluczowy element ułatwiający rozpoznawanie wybranych cząsteczek, nadając materiałowi polimerycznemu swoiste powinowactwa do jednego rodzaju struktury. Ogromną zaletą tej technik jest to, że w polimerze można utrwalić odciski molekularne różnych cząsteczek wzorców, co pozwala otrzymać specyficzne polimery selektywnie je rozróżniające (5, 6, 7). W chwili obecnej są dostępne w handlu kolumnienki SPE MIP firmy Supelco do oznaczania w różnych matrycach biologicznych następujących leków: chloramfenikol, *beta*-agoniści oraz *beta*-blokery.

Celem pracy było opracowanie metody identyfikacji oraz ilościowego oznaczania CAP w moczu metodą LC-MS/MS w oparciu o dane z piśmiennictwa oraz doświadczenia własne, która spełniałaby zalecenia decyzji komisji 2003/181/WE i 2002/657/WE. W procesie przygotowania próbek do analizy wykorzystano kolumnienki SupelMIP SPE – Chloramfenikol.

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki. Standard chloramfenikolu firmy Sigma-Aldrich (<99%). Standard wewnętrzny chloramfenikol-d5 (roztwór 100 µg/cm³ w acetonitrylu) firmy Cambridge Isotope Laboratories (Catalogue No. FSD-117-100, 98%). Kolumnienki SupelMIP SPE – Chloramfenikol 25 mg (Catalogue No.53210-U) firmy Supelco, acetonitryl LC-MS, acetonitryl, metanol, octan etylu, dichlorometan do analiz firmy Baker, kwas octowy, amoniak do analiz firmy Merck.

Materiał do badań. Próbkki moczu byłą były doprowadzane do pH = 7,0–7,5 kwasem octowym, wirowane przez 10 min przy szybkości obrotów 4500 rpm, a następnie filtrowane przez filtr strzykawkowy 0,45 µm PVDF. Próbkki do czasu analizy przechowywano w temp. –20°C. Próbkki moczu byłą były dostarczane w ramach krajowego programu badania pozostałości.

Przygotowanie próbek do analizy. Kolumnienki kondycjonowano 1 cm³ metanolu, a następnie 1 cm³ wody. Na tak przygotowane kolumnienki nanoszono po 1 g moczu. Kolumnienki przemywano kolejno 2 × 1 cm³ wody, 1 cm³ 5% acetonitrylu w 0,5% kwasie octowym, 2 × 1 cm³ 1% roztworu amoniaku, 1 cm³ 20% roztworu acetonitrylu w 1% roztworze amoniaku. Kolumnienki suszono przez 10 min

przy zastosowaniu próżni i następnie przemywano $2 \times 1 \text{ cm}^3$ 2% roztworem kwasu octowego w dichlorometanie. Kolumnienki suszono przez 2 min i eluowano $2 \times 1 \text{ cm}^3$ metanolem. Próbkę odparowywano na bloku grzejnym w temp. 45–50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 250 mm^3 fazy ruchomej woda–acetonitryl (80:20, v/v).

A n a l i z a LC-MS/MS. Do rozdzielania CAP stosowano chromatograf ciekłowy firmy Agilent 1100 wyposażony w pompę binarną oraz analityczną kolumnę chromatograficzną Luna C18 (2) ($150 \times 2 \text{ mm}$, wielkość ziarna $3 \mu\text{m}^3$) (Phenomenex, Torrance, USA) wraz z prekolumną o tym samym wypełnieniu.

W a r u n k i a n a l i z y LC: przepływ przez kolumnę $200 \text{ mm}^3/\text{min.}$, temp. kolumny 40°C, dozowana objętość 20 mm^3 , faza ruchoma A – woda, B – acetonitryl (80:20; v/v), gradient stężeń 0,0–0,1 min 80% A; 0,1–15,0 min. 0,0% A; 15–15,30 min. 80% A; 15,30–25,0 min. 20% A.

Do identyfikacji stosowano spektrometr mas API 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Canada) sprzężony z chromatografem ciekłym oraz zawór odcinający (Valco instrument Co. Inc., Huston, TX, USA). Jonizację przeprowadzono metodą rozpylania cieczy zawierającej badaną substancję w polu elektrycznym (ang. electrospray ionisation – ESI).

W a r u n k i a n a l i z y ESI-MS-MS: polaryzacja ujemna, gaz kolizyjny azot, temp. kapilary 400°C, napięcie kapilary elektrospreju (ESI) 3500 V, tryb pracy MRM i czas przemiatania 150 ms. Identyfikację i oznaczanie ilościowe CAP prowadzono w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM. Monitorowano przejścia MRM dla CAP (m/z) 321→152 (18 eV), 321→257 (14 eV) i CAP-d5 (IS) (m/z) 326→157 (23 eV).

W nawiasie podano wartości energii kolizyjnej. W celu uzyskania wykresu kalibracyjnego mierzono odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości CAP m/z 321→152 względem odpowiedzi na stałą ilość IS CAP-d5 m/z 326→157. Stosunek tych dwóch odpowiedzi wykreśla krzywą wzorcową względem ilości CAP. Sporządzono krzywą wzorcową w oparciu o próbki wzbogacone w zakresie 0,0–1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Wartość CAP w próbce obliczono z krzywej wzorcowej.

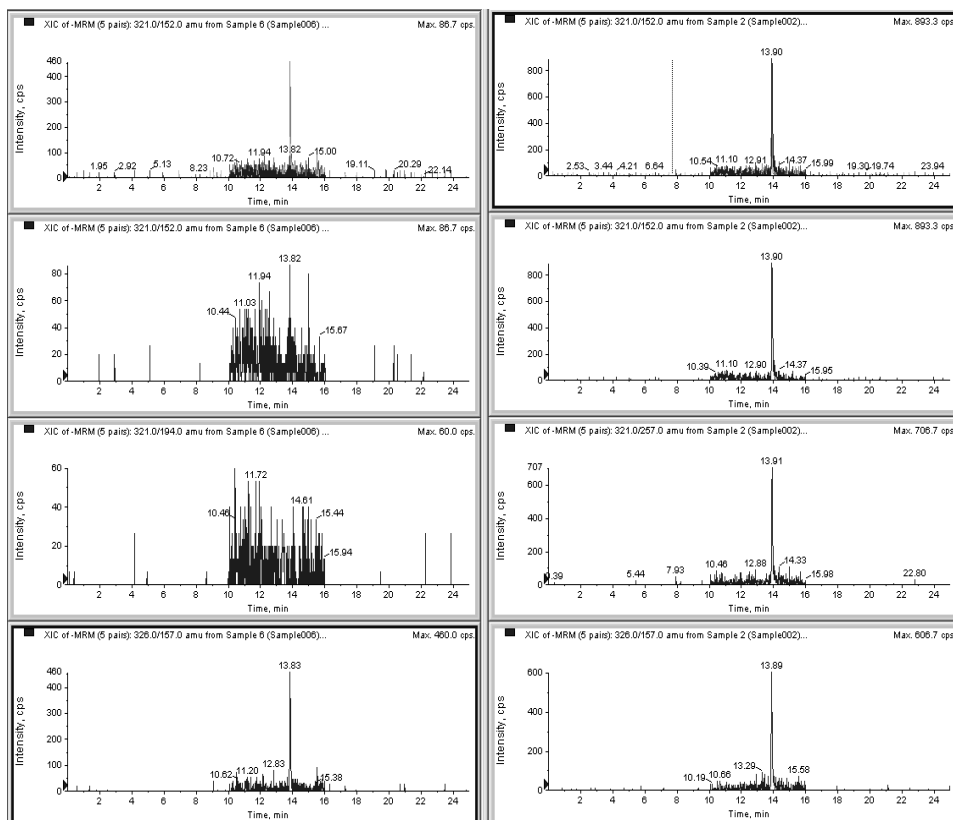
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Występowanie efektów matrycowych występujących przy oznaczaniu CAP w moczu była sprawdzana metodą dodatku wzorca. Polega on na porównaniu całkowitego prądu jonowego (TIC) dla wszystkich przejść MRM przy zastosowaniu do oczyszczania próbek MIP otrzymanej matrycy moczu po dodaniu wzorca (mocz + CAP) względem wzorca (CAP). Nie stwierdzono, obniżenia lub podwyższenia sygnału analitu moczu + CAP względem wzorca CAP. W procesie walidacji sprawdzono czy wybrana metoda oznaczania pozostałości CAP w moczu spełnia kryteria zawarte w decyzji Komisji nr 2002/657/WE (8) stawiane metodom potwierdzającym przy zastosowaniu układu LC-MS/MS niskiej rozdzielczości. Według ww. decyzji metody potwierdzające stosowne do oznaczeń pozostałości (grupa A) z zastosowaniem układu LC-MS/MS niskiej rozdzielczości muszą spełniać następujące kryteria:

- posiadać minimum 4 punkt identyfikacyjne;

- stosunek sygnału do szumu dla każdego jonu diagnostycznego powinien wynosić $\geq 3:1$;
- natężenia jonów diagnostycznych muszą być w granicach tolerancji zawartej w tab. 4 ww. decyzji (8).

Stwierdzono, że metoda posiada cztery punkty identyfikacyjne. Jonom macierzystym oznaczanych analitów przypisywany jest 1 punkt zaś jonom potomnym pierwszej generacji 1,5 punktu. W przypadku CAP mamy jon macierzysty o m/z 321 i dwa jony potomne pierwszej generacji o m/z 152 i 257 co daje w sumie 4 punkty. Stosunek sygnału do szumu sprawdzano przez porównanie sygnałów otrzymanych z próbek wzmocnionych na poziomie 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i matrycy. Stosunek ten dla każdego jonu diagnostycznego był mniejszy niż 3:1. Obliczone średnie względne natężenie jonów diagnostycznych m/z 321→257 do 321→152 mieściło się w granicach tolerancji i było $78 \pm 20\%$. Obliczone wartości $CC\alpha$ i $CC\beta$ są niższe od MRPL, która wynosi dla moczu zwierząt 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Na ryc. 1 przedstawiono MRM chromatograf matrycy i próbki moczu bydła wzmocnionej CAP na poziomie 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Ryc. 1. Chromatogram MRM z ekstraktu moczu bydła – matryca (a) i próbka wzmocniona na poziomie 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP.

Fig. 1. MRM chromatograms of bovine urine extract matrix (a), and spiked sample at 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CAP.

Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z zaleceniami zawartymi w decyzji Komisji nr 2002/657/WE (8). Wyznaczono dla każdej matrycy następujące parametry statystyczne metody: specyficzność, liniowość, powtarzalności, poprawność (odzysk), dokładność (błąd względny), odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjną oraz limit decyzyjny wartości granicznej ($CC\alpha$) i zdolności wykrycia ($CC\beta$).

Specyficzność metody zbadano za pomocą próbek ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), matryc oraz matryc wzbogaconych pochodzących od moczu bydła. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanych związków. Określono liniowość krzywej wzorcowej wykorzystując przejścia dla poszczególnych jonów o m/z CAP oraz standardu wewnętrznego CAP-d5. Współczynnik korelacji krzywych wzorcowych wykonanych na próbkach wzmocnionych w zakresie 0,1–1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wynosił $\geq 0,995$. Według decyzji Komisji nr 2002/657/WE powtarzalność, poprawność oraz odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna została obliczona na podstawie próbek wzbogaconych na poziomie 1,0 1,5 i 2-krotności dopuszczalnego MRPL co odpowiada 0,3; 0,45, 0,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Powtarzalność, poprawność oraz dokładność zostały obliczone na podstawie analizy próbek wykonanych na tym samym przyrządzie pomiarowym i przez tego samego operatora. Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna została wykonana w trzech różnych dniach na tym samym przyrządzie pomiarowy przez różnych operatorów. $CC\alpha$ i $CC\beta$ obliczono na podstawie krzywych kalibracji wyznaczonych na podstawie próbek wzmocnionych zgodnie z PN-ISO 11843-2 (9). Obliczone współczynniki zmienności powtarzalności ($CV_r\%$) były niższe od 11%. Współczynniki zmienności odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej ($CV_R\%$) były poniżej 12%. Zgodnie z decyzją nr 2002/657/WE dopuszczalna wartość współczynnik CV_R nie może być obliczona z równania *Horwita*. Wzmocnienie próbek poniżej poziomu 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ daje wysokie wartości CV_R , które są niemożliwe do zaakceptowania. Dlatego też wartość CV_R musi być najniższa, jaką można uzyskać w badaniach wewnątrzlaboratoryjnych. Średni odzysk przy wzmocnieniu w moczu w zakresie 0,3–0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wynosił 86–93%. Obliczone wartości $CC\alpha$ i $CC\beta$ były niższe od MRPL, które wynosi dla moczu 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W tab. I przedstawiono uzyskane parametry statystyczne metody oznaczania CAP w moczu bydła.

Tab e l a I. Statystyczna charakterystyka metody oznaczania CAP w moczu bydła

Tab l e I. Statistical characteristics of the method for determination of chloramphenicol in bovine urine

Poziom wzmocnienia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,30	0,45	0,60	Poziom akceptacji
Wartość średnia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,287	0,428	0,571	
CV_r (%)	8,9	10,1	10,7	35
Średni błąd względny (RF%)	-4,3	-4,9	-4,8	-20÷10
Średni odzysku (%)	87	93	86	50÷120
CV_R (%)	9,4	10,5	11,8	
$CC\alpha$ limit decyzyjny ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,07			
$CC\beta$ zdolności wykrycia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,09			

Przedstawiona metoda oznaczania jakościowego i ilościowego CAP w moczu była przy zastosowaniu do oczyszczania kolumnienek SupelMIP SPE – Chloramfenikol oraz techniki LC-ESI-MS/MS spełnia wymagania decyzji Komisji nr 2002/657/WE i 2003/181 WE. Opracowana procedura jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości CAP w moczu bydła.

L. Rodziewicz

DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN BOVINE URINE BY LC-MS/MS USING MOLECULAR IMPRINTED POLYMERS

Summary

A method of detection and quantitative determination of chloramphenicol (CAP) in bovine urine has been reported. Sample was cleaned by molecularly imprinted polymers (MIP). The MIP was used as a solid-phase extraction medium for extraction of CAP from bovine urine. The determination was performed by LC-ESI-MS/MS. The LC unit was equipped with a Luna C18 Phenomenex column. The mass spectrometer was operated in multiple reaction monitoring mode (MRM) with negative electrospray interface (ESI). Three transitions were monitored: m/z 321→152, 321→257, 326→157(IS) and for quantification, the transition m/z 321→152 was chosen. The method was validated according to the criteria of Commission Decision No 2002/657/EC for the analysis of veterinary drug residues. The validation included the determination of specificity, linearity, repeatability, trueness, within-laboratory reproducibility, decision limit ($CC\alpha$) and detection capacity ($CC\beta$). The samples were spiked at CAP levels 0.30, 0.45 and 0.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with CAP-d5 as the internal standard. The calculated repeatability variation coefficients (CV_r %) were lower than 11 %, and the accuracy ranged from -4.9 to -4.3. The within-laboratory repeatability variation coefficients (CV_R %) were below 12%. The decision limit ($CC\alpha$) and detection capacity ($CC\beta$), 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively were better than the minimum required performance limit set by the EU at 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Recoveries ranged from 86% to 93%.

PIŚMIENNICTWO

1. Decyzja Komisji z dnia 13 marca 2003 r. 2003/181/WE zmieniająca decyzję 2002/657/WE w odniesieniu do ustalenia minimalnych wymaganych wartości granicznych wydajności (MPRL) dla niektórych pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. – 2. Rodziewicz L., *Zawadzka I.*: Determination of chloramphenicol in animals urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Bull. Vet. Inst. Puławy. 2008; 52: 431-434. – 3. Rønning H.T., Einarsen K., Asp T.N.: Determination chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk and urine with liquid chromatography – tandem mass spectrometry, and validation of the method based on 2002/657 EC. J. Chromatogr. A 2006; 1118: 226-233. – 4. Tuerk J., Reinders M., Dreyer D.: Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring – Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection. J Chromatogr B, 2006; 831: 72-80. – 5. Boyd B., Björk H., Billing J.: Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. J. Chromatogr. A. 2007; 1174: 63-71. – 6. Schirmer C., Meisel H.: Molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of chloramphenicol. Anal. Bioanal. Chem., 2008; 392: 223-229. – 7. Tamayo F., Turiel E., Martin-Esteban A.: Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. J. Chromatogr. 2007; 1152: 32-40. – 8. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23 dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji. – 9. PN-ISO 11843-2: Zdolność wykrywania. Cz. 2. Metrologia w przypadku kalibracji liniowej. PKN, lipiec 2003; 19: 1-13.

Adres: 15-959 Białystok, ul. Zwycięstwa 26A.