

Jelena Doroszkiewicz-Fiedoruk, Lech Rodziewicz

OZNACZANIE SULFONAMIDÓW W MIODZIE METODĄ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ Z DETEKcją FUORESCENCYJNĄ

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

Przedstawiono metodę oznaczania siedmiu sulfonamidów (sulfatiazol, sulfacetamid, sulfamerazyna, sulfametazyna, sulfametoksazol, sulfadimetoksyna, sulfametoksypirydazyna) w miodzie. Próbkę rozpuszczano w kwasie solnym, oczyszczano metodą SPE na kolumnkach Oasis HLB i upochođniano fluorescencją. Pochodne oznaczano przy pomocy LC z detekcją fluorescencyjną. Do rozdzielania stosowano kolumnę chromatograficzną Luna C-18 Phenomex z izokratyczną płyną fazą składającą się z acetonitrylu, metanolu i kwasu octowego (1%) (10:45:45, v/v/v). Metodę walidowano zgodnie z kryteriami Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Współczynniki zmienności (CV %) były niższe niż 9%, a średnie odzyski mieściły się w zakresie 56–79%. Decyzyjne wartości graniczne (CC α) oraz zdolność wykrywania (CC β) mieściły się odpowiednio w zakresie 33,4–35,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 39,4–42,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Hasła kluczowe: sulfonamidy, oznaczanie pozostałości, miód, chromatografia cieczowa.

Key words: sulfonamides, residue determination, honey, liquid chromatography.

Sulfonamidy są to związki krystaliczne, trudno rozpuszczalne w wodzie. Oznaczają się dość szerokim spektrum działania obejmującym liczne drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne.

Sulfonamidy w naturalnych miodach pszczelich mogą występować jako pozostałości preparatów weterynaryjnych stosowanych do zwalczania zgnilca złośliwego. Najczęściej stosowanym preparatem jest Polisulfamid w skład którego wchodzi trzy sole sodowe sulfonamidów: sulfatiazol, sulfacetamid, sulfametazyna. Niekontrolowane i nadmierne stosowanie tych związków w leczeniu pszczoł może prowadzić do zanieczyszczenia miodu ich pozostałościami. Sulfonamidy przedostając się z miodem do organizmu człowieka mogą stać się przyczyną zatrucia i alergii. Według Dyrektywy Unijnej 2002/657/WE obowiązującej od dnia 14 sierpnia 2002 r. sulfonamidy zostały zakwalifikowane do grupy B, czyli mają wyznaczony MRL i mogą być stosowane w lecznictwie weterynaryjnym (1). Dla miodu suma ich pozostałości wynosi 0,05 mg/kg.

Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemem mas (LC-MS/MS) (2, 3, 4) i chromatografia cieczowa z detektorem fluorescencyjnym (LC-FLD) (5, 6, 7) jest

techniką szczególnie rozpowszechnioną w analizie pozostałości sulfonamidów w miodzie. Jednakże, ze względu na wysoki koszt zakupu LC-MS/MS przeważnie do ich identyfikacji oraz oznaczania ilościowego w miodzie stosowano układ LC-FLD, który spełnia zalecenia decyzji Komisji nr 2002/657/EC. Zastosowanie tego układu możliwe jest po uprzednim upochodnieniu sulfonamidów, ponieważ nie wykazują one naturalnej fluorescencji. Do otrzymania pochodnej stosowano przeważnie fluorescaminę. Pozwoliło to zwiększyć czułość i specyficzność oznaczenia. LOD przy zastosowaniu detektora FLD jest ok. 100-krotnie niższy niż w detektorze spektrofotometrycznym (UV).

Celem pracy było opracowanie, w oparciu o dane z piśmiennictwa oraz doświadczenie własne, metody identyfikacji oraz ilościowego oznaczania 7 sulfonamidów (sulfatiazol, sulfacetamid, sulfamerazyna, sulfametazyna, sulfametoksazol, sulfadimetoksyna, sulfametoksypyridazyne) w miodzie pszczelim przy zastosowaniu układu LC-FLD, która spełniałaby zalecenia Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Opracowana procedura jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości sulfonamidów w miodzie.

MATERIAŁ I METODY

Przygotowanie próbki do analizy. Do próbek wirówkowych poj. 30 cm³ odważano po 4 g miodu, dodawano po 10 cm³ kwasu solnego o stęż. 2 mol/dm³ i dokładnie mieszano. Ekstrakty inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Próbkę wirowano i pobierano po 7 cm³ uzyskanych ekstraktów, dodawano po 5 cm³ kwasu cytrynowego o stęż. 0,3 mol/dm³ i doprowadzano do pH 4,0 za pomocą NaOH o stęż. 5 mol/dm³. Tak uzyskane ekstrakty poddawano oczyszczaniu na kolumnkach Oasis HLB.

Kolumnki z sorbentem HLB poddawano kondycjonowaniu 5 cm³ acetonitrylu oraz 5 cm³ wody. Ekstrakty przepuszczano przez kolumnki z prędkością 1–2 krople/sek. Po przejściu ekstraktu kolumnki przemywano 5 cm³ wody i osuszano pod próżnią (2–3 min). Badane związki eluowano acetonitrylem 2 razy po 2,5 cm³ do próbek, w których znajdowało się po 100 µl mieszaniny glikol etylenowy: acetonitryl (1:9). Eluat zagęszczano w strumieniu azotu w temp. ok. 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,4 cm³ buforu octanowego o pH 3,5 i dodawano po 0,1 cm³ roztworu fluorescaminy. Dokładnie mieszano i pozostawiano do inkubacji przez 30 min. Tak przygotowane ekstrakty analizowano za pomocą chromatografu cieczowego Hewlett Packard 1100 z detektorem FLD.

Warunki analizy HPLC oznaczania sulfonamidów były następujące: detektor – FLD Ex: $\lambda = 405$ nm., Em: $\lambda = 495$ nm., kolumna chromatograficzna C18, 150 × 4,6 mm, 3 µm, faza ruchoma – acetonitryl do HPLC, metanol do HPLC, 1% kwas octowy 10:45:45 (v/v/v), przepływ 0,7 cm³/min, temp. kolumny analitycznej 25°C, objętość dozowana 20 µl. Identyfikację związków w próbce przeprowadzano poprzez porównanie czasów retencji pików występujących w badanych ekstraktach z pikami odpowiedniego wzorcowego roztworu roboczego i próbki fortyfikowanej.

Tożsamość substancji badanej była potwierdzana, jeżeli czas retencji pików próbek badanej oraz pików wzorca nie różniły się więcej niż $\pm 2,5\%$. Jeżeli identyfikacja

substancji dającej pik na chromatogramie – na podstawie jego kształtu lub otrzymanego wyniku – była wątpliwa, obecność analizowanej substancji potwierdzano przez zastosowanie kochromatografii. Ekstrakt próbki wzbogacano poprzez dodanie odpowiedniej ilości roztworu roboczego. Ilość dodanych sulfonamidów była porównywalna do ilości zawartej w ekstrakcie próbki.

Zawartość poszczególnych związków w badanej próbce obliczano wykorzystując następujący wzór:

$$X = \frac{V \cdot C}{M}$$

gdzie: X – zawartość związku w analizowanej próbce, $\mu\text{g}/\text{kg}$, M – masa badanej próbki, g, V – objętość końcowa ekstraktu, cm^3 , C – stężenie sulfonamidów w próbce, ng/cm^3 .

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

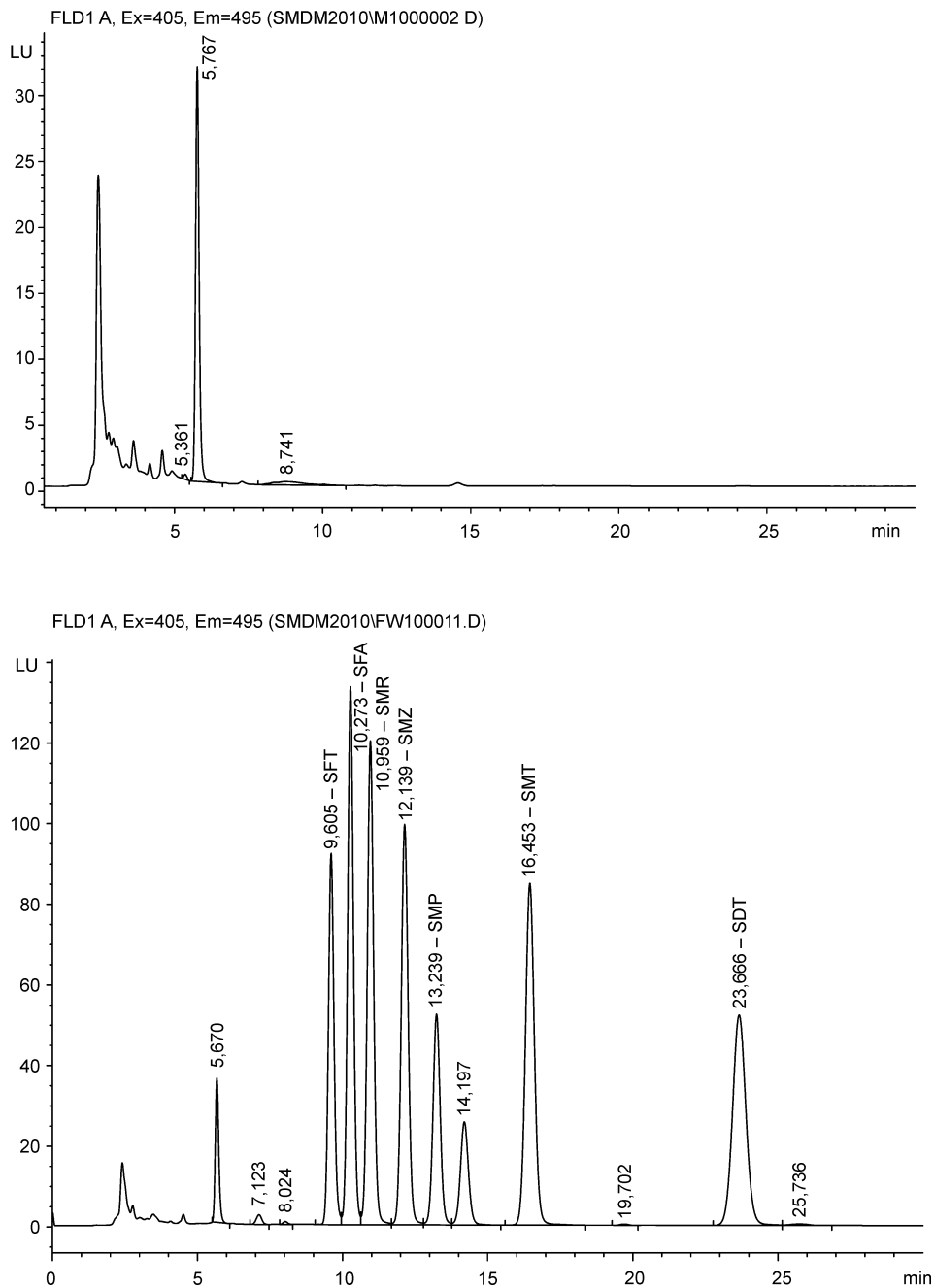
Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z zaleceniami zawartymi w decyzji Komisji nr 2002/657/WE (8). Wyznaczono dla każdej matrycy następujące parametry statystyczne metody: specyficzność, liniowość, powtarzalności, poprawność (odzysk), dokładność (błąd względny), odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną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

Specyficzność metody zbadano przy użyciu próbek ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), matryc miodu oraz matryc wzbogaconych znaną ilością analitu. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanych związków. Względny czas retencji sulfonamidów w próbkach wzbogaconych do czasu retencji wzorców jest taki sam z tolerancją $\pm 2,5\%$. Na ryc. 1 przedstawiono typowy chromatogram próbki wzmocnionej matrycy miodu na poziomie $25 \mu\text{g}/\text{kg}$. Chromatogram uzyskano przy zastosowaniu układu LC-FLD.

Zakres liniowości metody określono na podstawie krzywych wzorcowych przygotowanych w oparciu o co najmniej 5 poziomów wzorca sulfonamidów w zakresie $12,5\text{--}200 \mu\text{g}/\text{kg}$. Współczynnik korelacji wynosił powyżej 0,998.

W celu określenia powtarzalności, odtwarzalności i poprawności (odzysk) metody próbki miodu wzbogacano oznaczanymi stężeniami mieszaniny sulfonamidów na poziomie $12,5, 25, 50, 75, 125, 200 \mu\text{g}/\text{kg}$ dla każdego związku. Dla 7 oznaczanych sulfonamidów przy wzmocnienia w zakresie $12,5\text{--}200 \mu\text{g}/\text{kg}$ współczynnik zmienności wynosił $3,4\text{--}8,4\%$ zaś odtwarzalności $8,9\text{--}21,5\%$. Średni odzysk wynosił $56,1\text{--}79,1\%$.

Decyzja (7) wprowadza dwa nowe parametry wykonawcze, jakie musi spełniać metoda potwierdzająca. Jest to decyzyjna wartość graniczna ($CC\alpha$) oraz zdolność wykrywania ($CC\beta$). $CC\alpha$ oznacza wartość graniczną od poziomu, której, można wnioskować z prawdopodobieństwem błędu α , że próbka jest niezgodna (fałszywie dodatnia) i wynosi ona dla sulfonamidów (grupa B) 5% . $CC\beta$ jest to najniższe stężenie analitu, które może być wykryte, zidentyfikowane i oznaczone w próbce z prawdopodobieństwem $1 - \beta$. Błąd β jest to prawdopodobieństwo uznania próbki za fałszywie ujemną i wynosi on dla sulfonamidów 5% . Oba te parametry służą do



Ryc. 1. Chromatogram LC-FLD z matrycy miodu i matrycy wzmocnionej siedmioma sulfonamidami na poziomie 25 µg/kg.

Fig. 1. LC-FLD chromatograms of matrix honey and matrix honey spiked with seven sulfonamides at 25 µg/kg.

jednoznacznej interpretacji wyników analiz pozostałości chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego. $CC\alpha$ i $CC\beta$ obliczono dla każdego sulfonamidu na podstawie krzywych kalibracji wyznaczonych na podstawie próbek wzmocnionych zgodnie z PN-ISO 11843-2 (8). $CC\alpha$ mieściła się w granicach 33,9–35,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, zaś $CC\beta$ 39,4–42,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Przy szacowaniu niepewności wyniku uwzględniono niepewności standardowe wynikające z powtarzalności metody, ważenia próbki, błędu systematycznego metody, stosowania wzorców oraz naczyń pomiarowych. W celu uzyskania niepewności rozszerzonej, złożoną niepewność standardową mnożono przez współczynnik rozszerzenia $k = 2$ przy poziomie ufności $\alpha = 0,95$. W tab. I przedstawiono uzyskane parametry statystyczne metody oznaczania sulfonamidów w miodzie wzbogaconym na poziomie 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Table I. Statystyczna charakterystyka metody oznaczania sulfonamidów w miodzie (wzmocnienie na poziomie 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table I. Statistical characteristics of the method for determination of sulfonamides in bee honey (spiked at 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Parametry statystyczne	SFT	SFA	SMR	SMZ	SMP	SMT	SDT
Wartość średnia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	17,1	15,5	18,2	17,4	17,2	16,8	18,1
Powtarzalności, CV (%)	7,4	5,1	5,6	4,7	4,5	6,3	4,8
Średni odzysk (%)	68,8	62,1	72,9	69,9	68,9	67,5	72,5
Odtwarzalności, CV (%)	17,4	21,5	14,9	19,0	8,9	11,4	13,9
$CC\alpha$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	33,9	34,5	35,2	34,0	35,1	35,9	35,2
$CC\beta$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	39,8	40,7	41,1	39,4	41,8	42,4	42,1
Niepewność rozszerzona (%)	24	19	25	18	17	21	18

WNIOSKI

1. Przedstawiona powyżej metoda pozwala na wykrycie pozostałości sulfonamidów na poziomie wynoszącym 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2. Opracowana procedura jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości tych związków w miodzie.

Jelena Doroszkiewicz-Fiedoruk, Lech Rodziewicz

DETERMINATION OF SULFONAMIDES IN HONEY BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION

Summary

The method is presented to analyze seven sulfonamides (sulfathiazole, sulfacetamide, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxazol, sulfadimethoxine, sulfachloropyridazine) in honey. The samples were dissolved in hydrochloric acid (2M), cleaned up Oasis HLB solid phase extraction (SPE) column and derivatized with fluorescamine. The derivatives were determined by LC with fluorescence detection. Chro-

matographic separation was done on a C-18 Phenomenex Luna column with an isocratic mobile phase consisting of acetonitrile, methanol and 1% acetic acid (10:45:45, v/v/v). The method validation was done according to the criteria laid down in Commission Decision No. 2002/657/EC. The validation includes the determination of specificity, linearity, repeatability, within-laboratory reproducibility, accuracy (recovery), decision limit (CC α), and detection capability (CC β). Honey samples were fortified with sulfonamides at 12,5 – 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The coefficients of variation (CV%) were lower than 9% and mean recoveries were between 56 – 79%. Within-laboratory reproducibility was better than 10% CV. CC α and CC β ranged 33,9 – 35,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and CC β 39,4 – 42,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively.

PIŚMIENNICTWO

1. Decyzja Komisji nr 2002/657/WE z dnia 12 sierpnia 2002 r. ustalająca kryteria dla metod analitycznych ich interpretacji.– 2. *Krivohlavek A., Smit Z., Bastinac M., Zuntar I., Plevic-Plevsic F.*: The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography – mass spectrometry method (LC/MS). *J. Sep. Sci.*, 2005; 28(13): 1434-1439.– 3. *Pang G.F., Cao Y.Z., Zhang J.J., Jia G.Q., Fan C.L., Li X.M., Liu Y.M., Li Z.Y., Shi Y.Q.*: Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *JAOC Int.*, 2005; 88(5): 1304-1311.– 4. *Verzegnassi L., Savoy-Perroud M.C., Stadler R.H.*: Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *J. Chromatogr. A*, 2002; 997: 77-87.– 5. *Pang G.F., Cao Y.Z., Fan C.L., Zhang J.J., Li X.M., Li Z.Y., Jia G.Q.*: Liquid chromatography – fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residue in honey. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003; 376: 534-541.– 6. *Posyniak A., Śniegocki T., Żmudzki A.*: Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2002; 46: 111-117.– 7. *Posyniak A., Żmudzki A., Niedzielska J., Śniegocki T., Grzebalska A.*: Sulfonamide residues in honey. Control and development of analytical procedure. *Apiacta*, 2003; 38: 249-256.– 8. 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.