

*Piotr Kowalski*

## WYKRYWANIE I OZNACZANIE SULFONAMIDÓW W TKANKACH JADALNYCH DROBIU ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku  
Kierownik: p.o. dr *D. Rajzer*

*W pracy zaprezentowano elektroforetyczną metodę wykrywania i ilościowego oznaczania wybranych sulfonamidów w tkankach jadalnych drobiu z zastosowaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Przedmiotem badań były: mięśnie, nerki, wątroba, płuka, serca, żołądki oraz skóra z tłuszczem. Przedstawione metody charakteryzują się dobrą wydajnością, powtarzalnością i dokładnością oznaczenia, a nakład pracy jest relatywnie mniejszy od tych opisanych w literaturze.*

Hasła kluczowe: pozostałości w tkankach drobiu, sulfonamidy, elektroforeza kapilarna.

Key words: residues in poultry tissues, sulfonamides, capillary electrophoresis.

Wśród wielu zagrożeń, które mogą nieść ze sobą produkty spożywcze pochodzenia zwierzęcego, kluczowe znaczenie mają pozostałości leków weterynaryjnych (głównie chemioterapeutyków i substancji o charakterze anabolicznym) oraz ryzyko związane z farmakoterapią zwierząt hodowlanych. Sulfonamidy stanowią jedną z pięciu najczęściej stosowanych grup chemioterapeutyków w hodowli zwierząt zarówno w celach leczniczych, jak również profilaktycznych. Popularność zawdzięczają szerokiemu spektrum aktywności przeciwbakteryjnej i stosunkowo niskiej cenie w porównaniu z innymi chemioterapeutykami. Podawane najczęściej w dość wysokich dawkach osiągają znaczne stężenia w tkankach mięsnych zwierząt. Skutkiem ich pozostałości w tkankach jadalnych i żywności pochodzenia zwierzęcego mogą być reakcje alergiczne, odczyny toksyczne u ludzi oraz rozwój zjawiska lekooporności bakterii chorobotwórczych. Niektóre z sulfonamidów wykazują również działania kancerogenne (1, 2). Ze względu na zdolności gromadzenia się tej grupy związków w tkankach zwierząt oraz stosunkową trwałość prawdopodobieństwo znalezienia ich pozostałości w żywności jest stosunkowo duże. Zalecane okresy karencji dla zwierząt, którym podawano preparaty zawierające sulfonamidy wynoszą: od 6 (dla drobiu) do 18 dni (dla bydła, świń i owiec). Jednakże nieprzestrzeganie tych okresów lub niewłaściwe użycie preparatów może powodować występowanie pozostałości powyżej ustalonych wartości.

Rozporządzenie Komisji Unii Europejskiej Nr 2377/90 EEC (będące podstawą prawną oceny bezpieczeństwa żywności) obliguje laboratoria do stałego nadzoru nad produktami pochodzenia zwierzęcego. Normy unijne określają również warto-

ści najwyższej dopuszczalnej pozostałości MRL (ang. maximum residue limit), która nie powinna przekraczać 100 µg/kg (ng/g) dla sumy wszystkich sulfonamidów w nerkach, mięśniach, wątrobie, tłuszczu oraz w mleku. Do oceny ryzyka pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w żywności przez wiele lat były stosowane jedynie testy mikrobiologiczne, które są mało selektywne i mogą prowadzić do błędnej interpretacji wyników. Najczęściej stosowaną metodą oznaczania sulfonamidów jest wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w połączeniu ze spektrometrią mas (MS) (3) lub tandemową spektrometrią (MS/MS) (4–6). Jednakże wysoki koszt detektora MS oraz konieczność uzyskania do analizy wyjątkowo czystych ekstraktów prób tkankowych sprawia, że zastosowanie go do rutynowych oznaczeń jest ograniczone w wielu laboratoriach. Odzyski uzyskiwane po czasochłonnej, wieloetapowej procedurze przygotowania prób nie zawsze są zadowalające a na dodatek często różnią się wielkością. Stąd poszukiwane są nowe, lepsze pod względem selektywności i czułości oznaczenia metodologie oznaczania pozostałości leków w żywności. Ostatnio coraz większą rolę w analizie pozostałości odgrywa oznaczenie sulfonamidów w produktach żywnościowych za pomocą CE przy użyciu detektora UV (7, 8) i z matrycą fotodiodową (DAD) (9, 10). W pracy zaproponowano użycie zautomatyzowanej aparatury do elektroforezy kapilarnej (CE), która znacznie ogranicza zużycie często toksycznych i kosztownych rozpuszczalników organicznych.

## MATERIAŁ I METODY

**Materiał badany.** Tkanki jadalne drobiu pozyskano z gospodarstwa rolnego w Ruszkowie (woj. mazowieckie). W trakcie chowu kurczęta otrzymywały tradycyjną karmę oraz miały zapewniony stały dostęp do wody, wolnej od jakichkolwiek stymulatorów wzrostu i substancji przeciwbakteryjnych. Po osiągnięciu masy ciała ok. 2 kg zwierzęta ubijano, pobierając stosowne tkanki jadalne, które stanowiły materiał bazowy do opracowania krzywych kalibracji. Do czasu procedury przygotowania próbek przechowywano je w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ . Materiałem, który posłużył do pracy były także tkanki jadalne indyków i kur pochodzące z marketów z terenu Trójmiasta. Mając na uwadze niewielkie, wręcz śladowe ilości analitów, procedury przeprowadzono przy użyciu prób tkankowych wzbogaconych w znane, określone ilości analizowanych związków. Jednocześnie analizie poddawano próbki rzeczywiste.

**Procedura ekstrakcyjna tkanek drobiowych.** Analizie poddano tkanki indycze i kurze: wątrobę, nerki, płucka, serca, mięśnie piersi i uda oraz skórę wraz z tłuszczem. Pobrane tkanki zhomogenizowano i odważono po 3 próbki z każdego homogenatu w ilości 3,0 g. Do każdej próbki dodano wzorzec wewnętrzny (sulfanilamid) i 6 cm<sup>3</sup> acetonitrylu. Otrzymaną mieszaninę wytrząsano mechanicznie, a następnie na łaźni ultradźwiękowej. Próbki odwirowano, a warstwę acetonitrylową z nad osadu odparowano do sucha na łaźni wodnej w temp.  $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$ . Pozostałość rozpuszczono w 0,2 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej i poddano ekstrakcji typu ciecz-ciało stałe (SPE) na kolumnach LiChrolut RP-C18. Po przepłukaniu kolumn wodą dejonizowaną, analizowane sulfonamidy wyeluowano

za pomocą 0,3 cm<sup>3</sup> metanolu, który następnie odparowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w 0,2 cm<sup>3</sup> buforu elektrolitycznego. Po odwirowaniu (7 min., 10000 g), próbki przechowywano w temp. –20°C do czasu analizy.

Badania przeprowadzone zostały na aparacie do elektroforezy kapilarnej – P/ACE 2100 firmy Beckman (Fullerton, USA) wyposażonym w detektor UV ze zmienną długością fali oraz system akwizycji danych. Do analiz wykorzystano niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową o średnicy 75 µm i całkowitej długości 57 cm (efektywna długość 51 cm). Parametry analizy elektroforetycznej były następujące: napięcie 20 kV, temp. układu 22°C, czas nastrzyku 2 s. Zastosowano bufor elektrolityczny o składzie 20% (v/v) metanolu 25 mmol/dm<sup>3</sup> dodecylan sodu oraz 10 mmol/dm<sup>3</sup> boraks (tetraboran sodu). Dla każdego z badanych sulfonamidów stwierdzono doświadczalnie liniową zależność przyrostu wysokości pików oznaczanych związków od stężenia, wyznaczono krzywą kalibracji (w zakresie 0,025–1,0 µg/g), a następnie przystąpiono do oznaczeń stężeń leku w poszczególnych tkankach jadalnych. Stężenia substancji leczniczej w analizowanych próbach obliczono z równań regresji, przy współczynniku regresji ( $r$ ) > 0,999. Ocena statystyczną wyników zebrano w tab. I. Parametry: CC $\alpha$  (limit decyzyjny wartości granicznej) oraz CC $\beta$  (limit/zdolność oznaczania), służące do interpretacji wyników badań pozostałości związków chemicznych w produktach żywnościowych, wyznaczono zgodnie z PN-ISO 11843-2. Wykazano również stabilność prób biologicznych zawierających wszystkie sulfonamidy (test zamrażania i rozmrażania przeprowadzono po 1 i po 3 miesiącach). Uzyskane wyniki walidacji metody w pełni odpowiadają wymogom stawianym oznaczeniom ilościowym.

T a b e l a I. Wartości precyzji, odzysków i ocena statystyczna wyników otrzymanych dla sulfonamidów oznaczanych w mięśniach drobiu za pomocą CE;  $r > 0,999$ ; ( $n = 6$ )

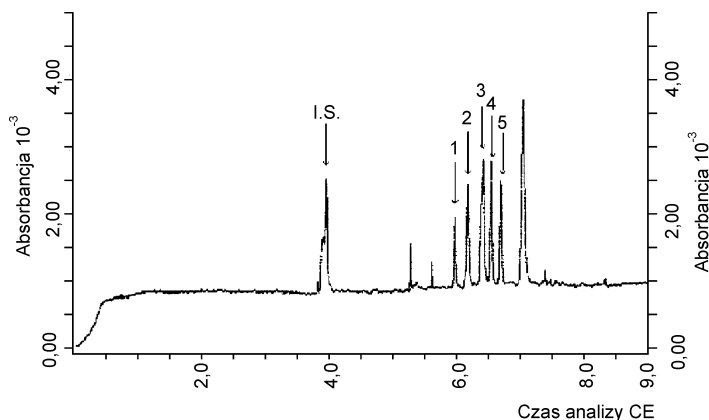
T a b e l e I. Quantitative performance test for CE. Summary of precision, recovery and validation data for sulfonamides in poultry muscle obtained with CE calibrations;  $r > 0.999$ ; ( $n = 6$ )

Parametry	Sulfa- metazyna	Sulfa- merazyna	Sulfa- furazol	Sulfa- metoksazol	Sulfa- tiazol	
Zakres kalibracji (µg/g)	0,025–1,0					
Nachylenie	1,726	1,948	2,422	2,495	2,460	
Przecięcie	–0,0065	–0,0005	–0,0015	–0,0046	0,0047	
LOD limit detekcji, (ng/g)	7,3	7,1	6,5	7,0	7,0	
LOQ limit oznaczalności (ng/g)	24,2	23,6	21,9	23,2	23,6	
CC $\alpha$ , limit decyzyjny (ng/g)	3,3	10,2	10,8	8,9	18,2	
CC $\beta$ , zdolność oznaczania (ng/g)	10,1	17,8	19,5	18,4	27,7	
Powtarzalność serii jednoczesnej RSD (%)	50 ng/g	7,4	9,3	8,0	7,7	7,4
	100 ng/g	7,0	6,7	7,1	6,6	6,1
	500 ng/g	3,5	3,1	3,1	2,4	3,2
Odtwarzalność w różnych dniach oznaczeń RSD (%)	50 ng/g	9,4	10,0	9,8	9,1	9,4
	100 ng/g	7,8	7,5	7,9	6,9	6,6
	500 ng/g	4,1	3,8	4,0	2,9	3,5
Całkowity odzysk (%)	94,5	92,8	94,5	97,3	86,2	

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Z uwagi na odmienne podstawniki w budowie strukturalnej, sulfonamidy posiadają zróżnicowane właściwości fizyko-chemiczne (rozpuszczalność, stopień jonizacji, różne wartości pKa między 4,8 a 10,4). To sprawia, że stanowią grupę leków, sprawiającą niekiedy analitykom wiele trudności, zwłaszcza w trakcie procesu ich wyizolowania ze skomplikowanych matryc biologicznych. Odpowiedni dobór rozpuszczalnika odbiarczającego i sposób ekstrakcji odgrywał kluczową rolę przy oznaczaniu śladowych ilości tych związków. W pracy podjęto próbę zastosowania dwóch typów ekstrakcji: ciecz–ciecz (ang. LLE – liquid-liquid extraction) z użyciem chloroformu oraz ekstrakcji do fazy stałej (ang. SPE – solid phase extraction) z użyciem kolumnienek C-18. Analizy wykazały, że pierwszy typ umożliwił wykrycie i oznaczenie znacznie większej liczby analitów (tj. sulfakarbamid, czy sulfacetamid, jednakże uzyskiwane odzyski były z reguły dwukrotnie niższe (ok. 40–45%). Jedynie w przypadku sulfametazyny i sulfamerazyny uzyskano porównywalne wartości odzysków dla obu typów ekstrakcji. Zastosowanie SPE i metanolu jako eluentu pozwoliło na selektywną ekstrakcję pięciu sulfonamidów, a wydajność procesu wynosiła powyżej 86%. W celu separacji wszystkich analizowanych związków, bufor analityczny został zmodyfikowany przez dodanie metanolu 20% (v/v), co znacznie poprawiło selektywność rozdzielania. Pomimo stosunkowo prostej procedury oczyszczania prób, nie zaobserwowano w obrazie elektroforetycznym interferencji pików oznaczanych leków, wzorca wewnętrznego i pików pochodzących z matrycy biologicznej (ryc. 1).

Istotnym elementem pracy była analiza prób tkankowych pochodzących z lokalnych sklepów. Badania pozostałości sulfonamidów przeprowadzono na próbkach



Ryc. 1. Elektroferogram próbki drobiowej tkanki mięśniowej, zawierającej wzorec wewnętrzny (I.S.), o stęż. 1  $\mu\text{g/g}$  oraz oznaczane sulfonamidy, o stęż. 0,2  $\mu\text{g/g}$  próby tkankowej; I.S. – sulfanilamid, 1 – sulfametazyna, 2 – sulfamerazyna, 3 – sulfafurazol, 4 – sulfametoksazol, 5 – sulfatiazol.

Fig. 1. Electropherogram of poultry muscle sample containing internal standard (I.S.) at concentration 1  $\mu\text{g/g}$  and analysed sulfonamides at concentration 0,2  $\mu\text{g/g}$  of sample; I.S. – sulfanilamide, 1 – sulfamethazine, 2 – sulfamerazine, 3 – sulfafurazole, 4 – sulfametoxazole, 5 – sulfatiazole.

tkanek kurzych i indyczych (mięśni piersi i uda, wątroby, płucach, sercach, żołądkach oraz skórze wraz z tłuszczem) nabytych w kilku marketach na terenie Trójmiasta. Wstępna analiza prób komercyjnych, w porównaniu z próbami pochodzącymi z hodowli eksperymentalnej, wykazała większą zawartość tłuszczu w tkankach komercyjnych. Zastosowanie acetonitrylu, pełniącego rolę zarówno ekstrahenta i czynnika usuwającego tłuszcz, nie wpłynęło na procedurę przygotowania próbek biologicznych, pochodzących z różnych źródeł. Analiza tkanek nabytych z marketów wykazała generalnie brak pozostałości analizowanych sulfonamidów powyżej granicy ich wykrywalności. Jedynie w dwóch próbkach wątroby i mięśni piersiowych wykryto śladowe ilości sulfamerazyny na poziomie nie przekraczającym limitu oznaczalności ilościowej (25 ng/g). Ponadto, obraz elektroforetyczny wykazał piki nielicznych substancji o charakterze drobnocząsteczkowym, świadczące o obecności prawdopodobnie niewielkich ilości konserwantów.

W przedstawionej pracy zaprezentowano procedurę oznaczenia pięciu sulfonamidów (sulfametazyny, sulfamerazyny, sulfafurazolu, sulfametoksazolu, sulfatiazolu) w tkankach jadalnych drobiu za pomocą elektroforezy kapilarnej. Zaproponowana metodyka z powodzeniem nadaje się do oznaczeń seryjnych, nie wymaga skomplikowanych procesów oczyszczania prób, a koszt pojedynczej analizy w porównaniu z innymi metodami jest znacznie mniejszy. Niewielka ilość ekstraktu potrzebnego do analizy i rozpuszczalników organicznych dodatkowo przemawiają za wykorzystaniem CE do oznaczeń pozostałości ze względów ekonomicznych. Ponadto, wyjątkowa transparentność szklanej kapilary, w której następuje separacja elektroforetyczna, umożliwia wykrywanie sulfonamidów znacznie poniżej wartości MRL, a sprawność i rozdzielczość układu umożliwia separacje nawet kilkunastu składników w ciągu kilku minut. Przedstawiona procedura oznaczania pozostałości sulfonamidów może być z powodzeniem wykorzystana w praktyce jako badanie monitoringowe pozostałości tej grupy leków w tkankach jadalnych zwierząt oraz w pozyskiwanych z nich produktach żywnościowych.

P. Kowalski

#### IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF SULFONAMIDE RESIDUES IN POULTRY TISSUES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

##### Summary

A simplified method of capillary electrophoresis (CE) with UV detection based on solid-phase extraction (SPE) was optimised and validated for simultaneous determination of sulfonamide residues in edible poultry tissues (muscle, kidney, liver, lung, heart, stomach, skin with fat). The extraction procedure enables quantitative determination of five sulfonamides used most frequently in veterinary medicine at concentrations far below the maximum residue limit of 25 µg/kg. The method was validated by evaluation of: linearity, trueness, precision, specificity, decision limit and detection capability as well as the limit of detection and quantitation. The recovery for all samples was better than 86%. Compared to the chromatographic method, the presented procedure is less expensive and much easier to perform for screening detection of sulfonamides in poultry tissues. Another advantage of CE used for sulfonamide analysis is that expensive organic solvents are no longer necessary.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Kishida K.*: Quantitation and confirmation of six sulphonamides in meat by liquid chromatography-mass spectrometry with photodiode array detection. *Food Control*. 2007; 18: 301-305. – 2. *Huang X., Yuan D., Huang B.*: Simple and rapid determination of sulfonamides in milk using Ether-type column liquid chromatography. *Talanta*. 2007; 72: 1298-1301. – 3. *Msagati T.A.M., Nindi M.M.*: Multiresidue determination of sulphonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*. 2004; 64: 87-100. – 4. *Granelli K., Branzell C.*: Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography- electrospray ionization- tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2007; 586: 289-295. – 5. *Shao B., Dong D., Wu Y., Hu J., Meng J., Tu X., Xu S.*: Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 2005; 546: 174-181. – 6. *Sergi M., Gentili A., Perret D., Marchese S., Materazzi S., Curini R.*: MSPD extraction of sulphonamides from meat followed by LC tandem MS determination. *Chromatographia*. 2007; 65:757-761. – 7. *Ackermans M.T., Beckers J.L., Everaerts F.M., Hoogland H., Tomassen M.J.H.*: Determination of sulphonamides in pork meat extracts by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 1992; 596: 101- 109. – 8. *Hows M.,E., P., Perrett D., Kay J.*: Optimisation of a simultaneous separation of sulphonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and  $\beta$ -lactam antibiotics by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*. 1997; 768:97-104. – 9. *Fuh M.R.,S., Chu S.Y.*: Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta*. 2003; 499: 215-221. – 10. *Soto-Chinchilla J.J., Garcia-Campana A.M., Gamiz-Garcia L., Cruces-Blanco C.*: Application of capillary zone electrophoresis with large-volume sample stacking to the sensitive determination of sulfonamides in meat and ground water. *Electrophoresis*. 2006; 27: 4060-4068.

Adres: 80-416 Gdańsk, al. Gen. Hallera 107.