

LECH RODZIEWICZ, IWONA ZAWADZKA

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI CHLORAMFENIKOLU W TKANKACH ZWIERZĄT METODĄ LC-MS/MS

DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN ANIMAL TISSUES BY LC-MS/MS METHOD

Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych
Zakład Higieny Weterynaryjnej
15-959 Białystok, ul. Zwycięstwa 26a
e-mail: rodziewicz @wiw.bianet.com.pl
Kierownik: dr L. Rodziewicz

W pracy przedstawiono metodę potwierdzającą oznaczania chloramfenikolu w tkance mięśniowej zwierząt przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS spełniającej zalecenia Decyzji Komisji nr 2003/181/WE i nr 2002/657/WE.

Słowa kluczowe: chloramfenikol, pozostałości, tkanka mięśniowa, LC-MS/MS
Key words: chloramphenicol, residues, muscle, LC-MS/MS

WSTĘP

Chloramfenikol (CAP) jest jednym z najstarszych antybiotyków wytwarzanym zarówno na drodze biosyntezy jak również syntezy chemicznej. Jest to związek źle rozpuszczalny w wodzie, dobrze wchłaniany z przewodu pokarmowego, przenika do płynu mózgowo-rdzeniowego, przez barierę łożyska i do mleka. Najwyższe stężenie stwierdza się w węzłach chłonnych, najniższe w mózgu. CAP wykazuje szeroki zakres działania bakteriostatycznego. Hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i dużych wirusów. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu syntezy białka w komórce bakterii. Z uwagi na wysoką toksyczność chloramfenikol został zakwalifikowany do substancji z grupy A. Oznacza to, że został skreślony z Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych stosowanych wyłącznie u zwierząt. Jest zabroniony do stosowania jako środek w leczeniu zwierząt, z których produkty przeznaczone są do spożycia. Określono minimalne wymagania wartości granicznej wydajności metod analitycznych MRPL (ang. *minimum required performance limit*) stosowanych do oznaczania CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego. MPRL jest to najmniejsza zawartość analitu jaka powinna być wykryta, zidentyfikowana i potwierdzona przez metodę analityczną. Wg decyzji Komisji nr 2003/181/WE wynosi ono 0,3 mg/kg dla mięsa, jaj, mleka, owoców morza (krewetki, kraby) i miodu [3]. Wśród metod instrumentalnych układy GC-ECD, LC-UV oraz LC-DAD nie

spełniają powyższego warunku, gdyż granice wykrywalności podawane przez różnych autorów są wyższe niż wymagany MPRL [6, 10]. Zgodnie z wymaganiami zawartymi w Decyzji Komisji nr 2002/657/WE metody potwierdzające stosowane dla grupy A muszą przekazywać informacje na temat struktury chemicznej analitu [4]. Warunek ten spełniają metody, w których są stosowane układy GC-MS oraz LC-MS.

Porównując obie techniki stosowane do oznaczania CAP stwierdzono, że metody oparte o stosowaniu układu LC-MS są prostsze niż GC-MS. W przypadku stosowania układu LC-MS do oznaczania CAP próbkę można analizować bez uprzedniego przeprowadzenia jej w pochodną. Również kolumny stosowane w LC znacznie lepiej tolerują zanieczyszczenia niż kolumny kapilarne w GC, których efektywność gwałtownie spada pod wpływem zanieczyszczeń. Ponadto metody jonizacji stosowane w LC-MS są przyczyną braku większej fragmentacji związków. Dlatego też układy LC-MS okazały się najbardziej efektywne do identyfikacji i oznaczania ilościowego CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego na poziomie dziesiętnych części mg/kg [6, 7, 8]. Procedura przygotowania próbek do MS jest podobna jak do LC. Polega ona na ekstrakcji wstępnej czyli izolacji CAP z badanego materiału, oczyszczaniu i zateżaniu otrzymanego ekstraktu. Różnice pomiędzy metodami dotyczą rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji (octan etylu, acetonitryl, metanol) lub buforu (fosforanowy, octanowy) do ekstrakcji, sposobu oczyszczania ekstraktu (kolumnienki C₁₈, żel krzemionkowy, tlenek glinu) oraz stosowanego układu do detekcji LC-MS lub LC-MS/MS [1, 5]. Układ LC-MS czyli sprzężenie chromatografu cieczowego z spektrometrem masowym stosowano do identyfikacji oraz oznaczania ilościowego CAP w mięśniach ryb [14] i owocach morza [12], zaś LC-MS/MS czyli sprzężenie chromatografu cieczowego z tandemową spektrometrią mas w mięśniach zwierząt [6, 7, 9, 14, 15] oraz owocach morza [7, 9, 10, 13].

Celem pracy było opracowanie w oparciu o dane z piśmiennictwa oraz doświadczenia własne prostej metody identyfikacji oraz ilościowego oznaczania CAP w tkance mięśniowej zwierząt przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS, która spełniałaby zalecenia decyzji Komisji nr 2003/181/WE i nr 2002/657/WE

MATERIAŁ I METODYKA

Wyposażenie pomiarowe

Chromatograf cieczowy firmy Agilent 1100, spektrometr masowy API 3000 LC-MS/MS System, waga analityczna o dokładności $\pm 0,1$ mg, waga laboratoryjna elektroniczna o dokładności $\pm 0,01$ g, pipeta automatyczna 1,0-10 ml, pipety elektroniczne 50-300 μ l, 50-1000 μ l, system oczyszczania wody Millipore, homogenizator laboratoryjny umożliwiający homogenizację tkanki, wirówka laboratoryjna, blok grzejny, wytrząsarka laboratoryjna, butla zawierająca sprężony czysty azot oraz typowe szkło laboratoryjne tj. pipety, kolby miarowe i probówki.

Odczynniki i roztwory

1. Woda, przynajmniej o trzecim stopniu czystości, zgodnie z normą PN-ISO 3696:1999, 2. acetonitryl do HPLC, 3. octan etylu cz.d., 4. heksan cz.d.a., 5. siarczan sodu cz.d.a., 6. standard wewnętrzny chloramfenikol – D5 (98% czystości) (CAP-D5), 7. substancja wzorcowa CAP, certyfikowany materiał odniesienia CRMs 445 prod. Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM).

Przygotowanie próbki do analizy

Materiał do badań stanowiły próbki tkanki mięśniowej pochodzącej od bydła, trzody, drobiu i ryb. Do czasu analizy próbki przechowywano w temperaturze poniżej -18°C . Przed rozpoczęciem

badania próbkę mięśni o masie 300-500 g doprowadzano do temperatury pokojowej. Z próbki mięśni usuwano zewnętrzny tłuszcz i części niejadalne. Próbkę laboratoryjną rozdrabniano przy użyciu maszynki do mielenia mięsa i dokładnie wymieszano.

Do próbek wirówkowych o pojemności 100 ml odważano po 3 g tkanki mięśniowej. Następnie dodawano 0,15 ml standardu wewnętrznego CAP-D5 o stężeniu 3,0 ng/ml, 3,0 g siarczanu sodu i 6,0 ml octanu etylu, homogenizowano przy obrotach ok. 5000/min przez 1 min. Następnie próbki wirowano przez 10 min przy szybkości ok. 3000 obr/min. Pobierano 4,0 ml uzyskanego ekstraktu (co odpowiada 2 g mięśni) i odparowywano do sucha na bloku grzejnym w temp. 45-50°C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1,0 ml acetonitrylu dodawano 2,0 ml heksanu, dokładnie mieszano i pozostawiano do rozdzielania faz. Ściągano warstwę heksanową i powtarzano oczyszczanie kolejną porcją heksanu. Warstwę heksanową odrzucano. Dolną warstwę odparowywano do sucha na bloku grzejnym w temp. 45-50°C w strumieniu azotu. Odparowane ekstrakty rozpuszczano w 1,0 ml fazy ruchomej acetonitryl do HPLC-woda 50:50 ($V_1 + V_2$).

Analiza LC-ESI-MS/MS

Do wstępnego rozdzielania CAP stosowano analityczną kolumnę chromatograficzną Luna C18 o wymiarach 150 x 2 mm, wielkość ziarna 3 μ m firmy Phenomenex oraz dodatkowo prekolumnę o tym samym wypełnieniu. Fazę ruchomą stanowił acetonitrylA/woda B o przepływie przez kolumnę 200 ml/min. Rozdział prowadzono w układzie gradientowym w temp 40°C według następującego programu: czas 0,0-11min A 20%, 11-11,5 min A 100 % i 11,5-22,0 min A 20%. Objętość dozowanego ekstraktu na kolumnę wynosiła 10 μ l.

Do identyfikacji i oznaczania ilościowego CAP w mięśniach zwierząt stosowano układ ESI-MS/MS-CID. Zasada działania tego układu polega na wybraniu jonu molekularnego (macierzystego) w pierwszym spektrometrze metodą rozpylania w polu elektrycznym (*ang. electrospray ionisation* – ESI).

W przypadku CAP jest $[M-H]^+$ o m/z 321 (^{35}Cl), który jest poddawany dalszej wtórnej fragmentacji w drugim spektrometrze przez kolizję (*ang. collision induced dissociation* – CID) dając trzy podstawowe jony potomne czyli fragmentacyjne $[M-H-(HCOCl)]^+$ o m/z 257, $[M-H-(NH_2COCHCl_2)]^+$ m/z 194 oraz $[O_2N-C_6H_4-CHOH]^+$ m/z 152.

Spełnia to wymagania decyzji Komisji nr 2002/657/WE, która dla potwierdzenia wymaga, co najmniej czterech punktów identyfikacyjnych. Cztery punkty można uzyskać jeżeli, jeden jon macierzysty daje dwa jony potomne w pierwszej generacji. W naszym przypadku jeden jon macierzysty daje cztery jony potomne. Rozdzielenie wiązki jonów według wartości stosunku m/z prowadzono z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego. Analizę próbek prowadzono w obecności IS d_5 – CAP. Układ pracował w trybie jonów ujemnych. Identyfikacje i oznaczanie ilościowe CAP prowadzono w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM – równoważnik SRM (*ang. metastable reaction monitoring*). W tabeli I przedstawiono przejścia m/z CAP i CAP-d5 wykorzystywane w analizie jakościowej i ilościowej.

W celu uzyskania wykresu kalibracyjnego mierzono odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości CAP m/z 321→152 względem odpowiedzi na stałą ilość IS m/z 326→157. Stosunek tych dwóch

Tabela I. Monitorowanie przejść MRM dla CAP i standardu wewnętrznego CAP-d5
MRM transitions monitored for CAP and internal standard CAP-d5

Przejścia używane w analizie jakościowej (m/z)		Energia kolizyjna (eV)	Przejścia używane w analizie ilościowej
CAP	323 → 257	14	321 → 152
	323 → 194	14	
	323 → 152	18	
CAP- d5	326 → 157	23	326 → 157

odpowiedzi wykreśla krzywą wzorcową względem ilości CAP. Sporządzono krzywą wzorcową o stężeniach CAP 0,2; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0 ng/ml i CAP-D5 0,6 ng/ml co odpowiada poziomowi wzmocnienia w próbce 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 mg/kg. Zawartość CAP w próbce obliczano z krzywej wzorcowej.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z zaleceniami zawartymi w decyzji Komisji nr 2002/657/WE [4]. Wyznaczono następujące parametry walidacji metody jak: specyficzność, liniowość, powtarzalność, odtwarzalność i poprawność (odzysk).

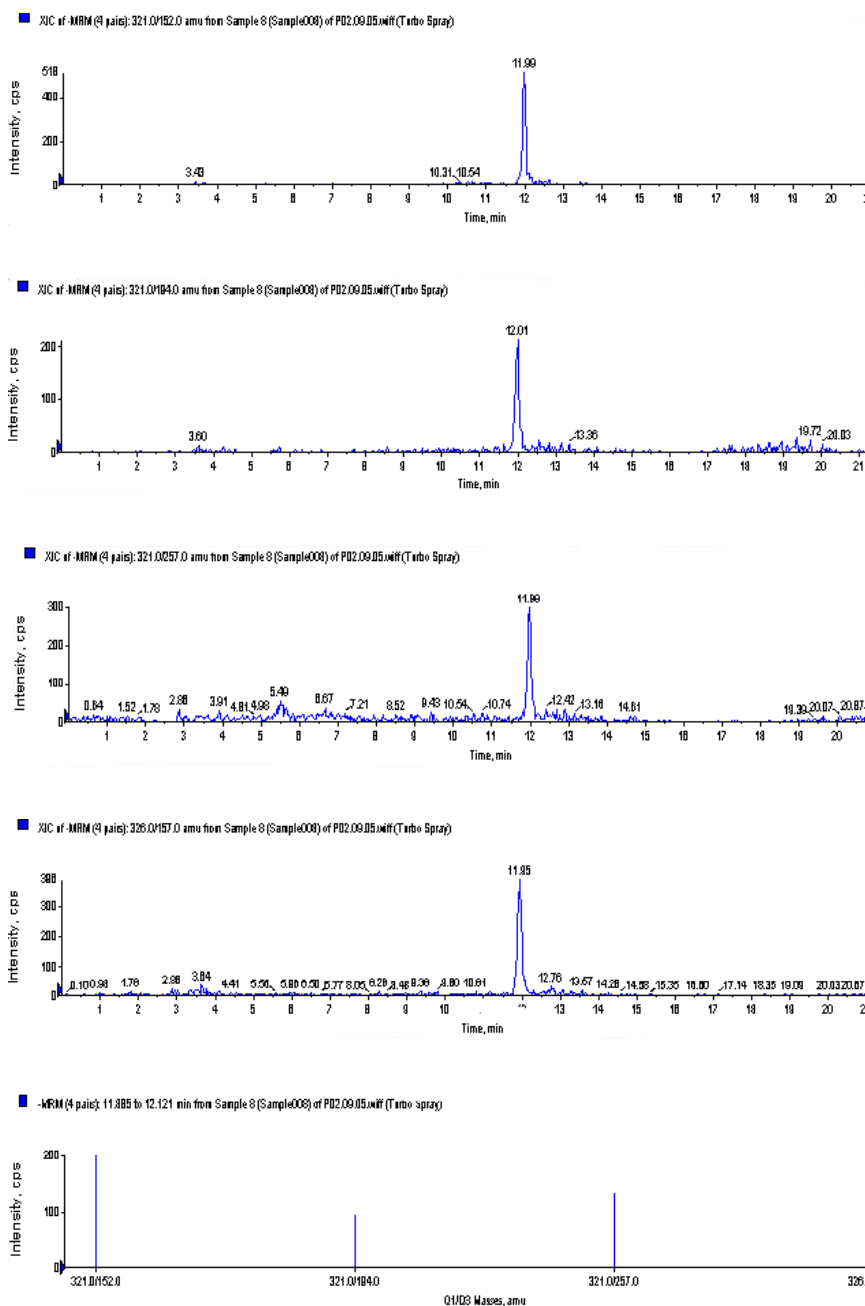
Specyficzność metody zbadano przy użyciu próbek czystych wzorców chemicznych CAP, ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), matryc tkanek mięśniowych, matryc wzbogaconych pochodzących od bydła, trzody, drobiu, ryb oraz materiału certyfikowanego CRMs 445. Wykazano, że stosunek sygnału do szum dla każdego przejścia jonu CAP o m/z 323 → 257, 323 → 194, 323 → 152 i standardu wewnętrznego CAP-d5 o m/z 326 → 157 wynosi $\geq 3:1$. Nie stwierdzono wpływu matrycy na wielkość sygnału do szumu. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanego CAP.

Określono liniowość krzywej wzorcowej wykorzystując przejścia dla jonów CAP o m/z 321 → 152 i standardu wewnętrznego CAP-D5 o m/z 326 → 157. Przyjęto, że zakres roboczy metody pokrywa się z zakresem liniowym, który wynosi 0,1–1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Na rycinie 1 przedstawiono typowe chromatogramy CAP i CAP-d5 próbki mięśni trzody wzmocnionej na poziomie 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela II. Statystyczna charakterystyka metody oznaczania CAP w tkance mięśniowej zwierząt
Statistical characteristics of the method for CAP determination in meat tissue

Matryca (tkanka mięśniowa)	Bydło	Trzoda	Drób	Ryba	Poziom akceptacji
Wartość średnia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,229	0,301	0,279	0,285	
Odchylenie standardowe powtarzalności ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,029	0,034	0,031	0,020	
Współczynnik zmienności powtarzalności (%)	12,63	11,30	11,11	7,02	35
Średni odzysk (%)	76,3	100,3	93,0	95,0	50-120
Odchylenie standardowe odtwarzalności ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,056	0,028	0,024	0,015	
Współczynnik zmienności odtwarzalności (%)	20,13	9,19	8,71	5,21	53
Decyzyjna wartość graniczna ($\text{CC}\alpha$) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,188	0,182	0,137	0,205	
Zdolność wykrycia ($\text{CC}\beta$) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,246	0,223	0,138	0,241	



Ryc. 1. Chromatogram LC-ESI-MS/MS z ekstraktu mięśni bydła, tryb pracy MRM, wzmocnienie matrycy CAP 0,3 ng/g
 LC-ESI-MS/MS chromatograms of bovine muscle extract, MRM mode, spiked matrix CAP 0,3 ng/g

W celu określenia powtarzalności, odtwarzalności, poprawności próbki mięśni bydła, trzody, drobiu oraz ryb wzbogacono CAP na poziomie 0,15, 0,3 i 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy gatunkami zwierząt, od których pobrano próbki, a odzyskami CAP. W tabeli II przedstawiono uzyskane parametry statystyczne oznaczania CAP w tkance mięśniowej różnych gatunków zwierząt przy wzbogaceniu na poziomie 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Decyzja Komisji nr 2002/657/EC wprowadza do walidacji metod dwa nowe parametry limit decyzyjny wartości granicznej ($CC\alpha$) oraz zdolności wykrywania ($CC\beta$). Limit decyzyjny jest to stężenie analitu w próbce przy i powyżej którego wynik analizy uznawany jest za niezgodny z prawdopodobieństwem $1-\alpha$. Błąd α jest to prawdopodobieństwo uznania próbki za fałszywie dodatnią i dla CAP (grupa A) wynosi 1%. Zdolność wykrycia jest to najniższe stężenie analitu, które może być wykryte, zidentyfikowane i oznaczone w próbce z prawdopodobieństwem $1-\beta$. Błąd β to jest prawdopodobieństwo uznania za fałszywie ujemną próbkę i dla CAP wynosi 5%. Oba parametry służą do jednoznacznej interpretacji wyników analiz pozostałości chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Parametry te zostały wyznaczone na podstawie krzywej kalibracji zgodnie z PN-ISO 11843-2 [11].

Przedstawione w tabeli II wartości $CC\alpha$ i $CC\beta$ rozstrzygają ze znanym prawdopodobieństwem czy w próbce znajduje się czy nie oznaczany CAP, lub czy jego wartość przekracza wartość graniczną. Dla metody potwierdzającej oznaczania CAP w tkance mięśniowej przy zastosowaniu układu LC-MS/MS wyniki są zgodne, jeżeli są poniżej wartości $CC\alpha$ wyznaczonej dla poszczególnych matryc. Przy zastosowaniu powyższego układu do metod przesiewowych wyniki są zgodne jeśli zawarte są poniżej wartości $CC\beta$. Wyniki powyżej $CC\beta$ wymagają potwierdzenia.

WNIOSKI

Przedstawiona metoda oznaczania jakościowego i ilościowego CAP w tkance mięśniowej zwierząt przy zastosowaniu układu LC-MS/MS spełnia wymagania decyzji Komisji nr 2003/181/WE i nr 2002/657/WE.

L. Rodziewicz, I. Zawadzka

DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN ANIMAL TISSUES BY LC-MS/MS METHOD

Summary

A liquid chromatographic method with mass spectrometric determination and identification (LC-MS/MS) for the determination of chloramphenicol (CAP) in tissues of animal origin was presented. Homogenized samples were extracted with ethyl acetate and evaporated to dryness followed by a clean-up using the liquid-liquid distribution between acetonitrile and hexane. Chloramphenicol was determined by LC-MS-ESI-MS in negative mode. There was used Phenomenex column with the mixture of acetonitrile-water as a mobile phase. The method was validated according to the criteria of Decision Commission No 2002/657/EC. Samples were fortified at CAP levels between 0.1 and 0.45 ng/g with 5d-CAP as internal standard. Recoveries for the level 0.3 ng/g were in the range 76.3-100.3%. Limit of decision ($CC\alpha$) was between 0.137-0.205 ng/g. Limit of quantification (LOQ) – 0.1 ng/g.

PIŚMIENNICTWO

1. *Balitz G., Hewitt A.*: Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometer. *Anal. Chim. Acta* 2003, 492, 105-131.
2. *Bogusz M., Hassan H., Al-Enazi E.*: Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography- electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2004, 807, 343-356.
3. Decyzja Komisji z dnia 13 marca 2003r. 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.
4. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23 dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji.
5. *Fedeniuk R., Shand P.*: Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices. *J. Chromatogr. A.* 1998, 812, 3-15.
6. *Gantverg A., Shishani I., Hoffman M.*: Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine liquid chromatography – tandem mass spectrometry versus gas chromatography – mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 125-135.
7. *Impens S., Reybroeck W., Vercammen J.*: Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS² and LC-MS². *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 153-163.
8. *Johnstone R., Rose M.*: Spektrometria mas. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2001.
9. *Mottier P., Parisod V., Gremaud E.*: Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2003, 994, 75-84.
10. *Neuhaus B., Hurlbut J., Hammack W.*: LC/MS/MS Analysis of chloramphenicol in shrimp. *LIB* 2002, 18, 1-13.
11. PN-ISO 11843-2: Zdolność wykrywania – Część 2: Metrologia w przypadku kalibracji liniowej. PKN, lipiec 2003, 19, 1-13.
12. *Ramos M., Munoz P., Aranda A.*: Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography- mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003, 791, 31-38.
13. *Storey J., Pfenning A., Turnipseed Sherri.*: Determination of chloramphenicol residues in shrimp and crab tissues by electrospray triple quadrupole LC/MS/MS. *LIB* 2003, 19, 1-13.
14. *Takino M., Daishima S., Nakahara T.*: Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography – atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1011, 67-75.
15. *Turnipseed S., Roybal J., Pfenning A.*: Use of ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products. *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 373-386.

Otrzymano: 2005.09.05