

LECH RODZIEWICZ, IWONA ZAWADZKA

OZNACZANIA POZOSTAŁOŚCI CHLOROPROMAZYNY W NERKACH I MOCZU ZWIERZĄT METODĄ LC-MS/MS

DETERMINATION OF CHLOROPROMAZINE RESIDUES IN ANIMALS KIDNEY AND URINE USING LC-MS/MS METHOD

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

W pracy przedstawiono potwierdzającą metodę oznaczania chloropromazyny w nerkach trzody i bydła oraz moczu przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS spełniającej wymagania Decyzji Komisji nr 2002/657/WE.

Słowa kluczowe: chloropromazyna, pozostałości, nerki, mocz, LC-MS/MS

Key words: chloropromazine, residue, kidney, urine, LC-MS/MS

WSTĘP

Chloropromazyna (CP) jest jednym z najstarszych neuroleptyków fenotiazynowych, które były stosowane w leczeniu weterynaryjnym w celu złagodzenia stresu zwierząt związanego z załadunkiem i transportem. CP podawano zwierzętom rzeźnym na kilka godzin przed ubojem. Stwierdzono, że po spożyciu żywności z pozostałościami CP występowały efekty niepożądane u ludzi takie jak: nadciśnienie tętnicze, żółtaczka mechaniczna oraz różne zmiany skórne [5]. Z uwagi na wysoką toksyczność została ona skreślona z Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych stosowanych wyłącznie u zwierząt. Mimo to istnieją podejrzenia, że CP może być wykorzystana przez nieuczciwych hodowców, co spowodowało, że związek ten został włączony do programu badań kontrolnych.

Główną drogą eliminacji CP u zwierząt jest mocz, co powoduje, że pozostałości tego związku oznacza się w nerkach oraz moczu zwierząt rzeźnych. Określone zostało tymczasowe minimalne wymagania wartości granicznej wydajności metod analitycznych MPRL (ang. *minimum required performance limit*) stosowanych do oznaczania CP w nerkach i moczu zwierząt, który wynosi 5,0 µg/kg. MPRL jest to najmniejsza zawartość analitu jaka powinna być wykryta, zidentyfikowana i potwierdzona przez stosowaną metodę analityczną. Warunek ten spełniają metody, w których są stosowane układy LC-UV [1, 2, 3], LC-FLD [6, 8], LC-MS [1, 10] i LC-MS/MS [3, 4, 9]. Jednak zgodnie z wymaganiami zawartymi w Decyzji

Komisji nr 2003/181/WE metody potwierdzające stosowane dla grupy A, do której należą substancje wykazujące działanie anaboliczne oraz substancje na stosowanie których nie ma urzędowego zezwolenia, muszą przekazywać informacje na temat struktury chemicznej analitu. Dlatego też metodami potwierdzającymi oznaczania CP mogą być wyłącznie metody, gdzie zastosowane zostały układy LC-MS i LC-MS/MS [2].

Procedura przygotowania próbek polega na ekstrakcji wstępnej, oczyszczaniu oraz zateżaniu otrzymanego ekstraktu. Różnice pomiędzy metodami dotyczą rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji (acetonitryl, acetonitryl/woda, metanol/woda /acetonitryl) oraz oczyszczaniu ekstraktu (kolumnienki SPE C-8, C-18, Oasis HLB).

Do identyfikacji oraz oznaczania ilościowego CP przeważnie stosowano układ LC-ESI-MS/MS. Najczęściej stosowaną metodą jonizacji jest rozpylanie cieczy zawierającej badaną substancję w polu elektrycznym (ang. *electrospray ionisation* – ESI). W celu wywołania wtórnej fragmentacji stosowano głównie metodę wzbudzania jonów przez kolizję (ang. *collision induced dissociation* – CID). Rozdzielenie wiązki jonów wg wartości stosunku m/z prowadzono z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego. Układ pracował w trybie jonów ujemnych. Identyfikacje i oznaczanie ilościowe prowadzono przeważnie w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM (ang. *metastable reaction monitoring*) [3, 4,10].

Celem pracy było opracowanie w oparciu o dane z piśmiennictwa oraz doświadczenie własne prostej metody identyfikacji oraz ilościowego oznaczania CP w nerkach i moczu zwierząt przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS, która spełniałaby zalecenia Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. [2].

MATERIAŁY 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 ± 10 mg, pipety automatyczne, system oczyszczania wody Millipore, łaźnia ultradźwiękowa, 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. metanol do LC - MS, 3. acetonitryl cz.d.a., 4. kwas octowy lodowaty cz.d.a., 5. substancja wzorcowa chloropromazyny (Sigma-Aldrich), 6. standard wewnętrzny chloropromazyna-d3 (Cambridge Isotope Laboratories. Inc.).

Przygotowanie próbek do analizy

Materiał do badań stanowiły próbki tkanki nerki oraz mocz pochodzącej od bydła i trzody. Do czasu analizy próbki były przechowywane w temp. poniżej -20 °C. Przed rozpoczęciem badania próbkę nerki doprowadzano do temperatury pokojowej. Rozdrabniano próbkę laboratoryjną przy użyciu maszynki do mielenia mięsa. Próbkę moczu dokładnie mieszano, wirowano przez 10 min przy szybkości ok. 3000 obr/min a następnie przefiltrowano przez filtr membranowy 0,45 μ m.

Do próbek wirówkowych o pojemności 100 ml odważano po 5,0 g próbki i dodawano do każdej po 50 ng standardu wewnętrznego. Następnie dodawano 20,0 ml acetonitrylu i homogenizowano na łaźni ultradźwiękowej ok. 10 min. Próbki wirowano przez 10 min przy szybkości ok. 3000 obr/min w temperaturze 4°C. Pobierano 2,0 ml uzyskanego ekstraktu do próbówki o poj. 10 ml i odparowywano do sucha na bloku grzejnym w temp. 45-50 °C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano

w 2,0 ml fazy ruchomej metanol do LC-MS – 0,05% kwas octowy 20:80 (V_1+V_2). Całość dokładnie mieszano i przepuszczano przez filtr membranowy PVDE 0,45 μm .

Analiza LC-ESI-MS/MS

Do wstępnego rozdziálu CP stosowano analityczną kolumnę chromatograficzną Luna C18 o wymiarach 150 x 2 mm, wielkość ziarna 3 μm firmy Phenomenex oraz dodatkowo prekolumnę o tym samym wypełnieniu. Warunki analizy LC: przepływ przez kolumnę 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, temp. kolumny 40 $^{\circ}\text{C}$, objętość dozowania 10 μl , faza ruchoma A - metanol do LC-MS, B - 0,05% kwas octowy, gradient stężeń 0,0 – 11min A 20%, 11-15 min A 100 %, 15 – 15,3 min A 20% i 15,3 - 25 min A 20 %.

Do identyfikacji i oznaczania ilościowego CP w nerkach i moczu zwierząt stosowano układ ESI-MS/MS-CID przy zastosowaniu zaworu odcinającego oraz analizatora kwadrupolowego. Warunki analizy ESI/MS/MS: polaryzacja ujemna, gaz, kolizyjny azot, temperatura kapilary 400 $^{\circ}\text{C}$, napięcie kapilary elektrospreju (ESI) – 3500 V, tryb pracy MRM, czas przemiatania 100 ms.

Identyfikację i oznaczanie ilościowe CP prowadzono w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM. W przypadku CP jon macierzysty $[M+1]$ m/z 319 daje dwa jony potomne o m/z 86 i 58 [3]. W tabeli I przedstawiono przejścia m/z CP i CP-d3 wykorzystywane w analizie jakościowej i ilościowej (w nawiasie podano wartość energii kolizyjnej).

Tabela I. Monitorowanie przejść MRM dla CP i standardu wewnętrznego CP –d3 MRM transitions monitored for CP and internal standard CP-d3

Przejścia używane w analizie jakościowej (m/z)		Energia kolizyjne (eV)	Przejścia używane w analizie ilościowej
CP	319 → 86	28	319→86
	319 → 58	29	
CP-d3	322→89	29	322→89

W celu uzyskania wykresu kalibracyjnego mierzono odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości CP m/z 319→86 względem odpowiedzi na stałą ilość IS CP-d3 m/z 322→89. Stosunek tych dwóch odpowiedzi wykreśla krzywą wzorcową względem ilości CP. Sporządzono krzywą wzorcową w oparciu o próbki wzbogacone na poziomie 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Zawartość CP w próbce obliczono z krzywej wzorcowej.

WYNIKI ICH OMÓWIENIE

Według decyzji Komisji nr 2002/657/WE metody potwierdzające stosowne do oznaczeń pozostałości (grupa A) z zastosowaniem układu LC-MS/MS niskiej rozdzielczości muszą spełniać następujące kryteria:

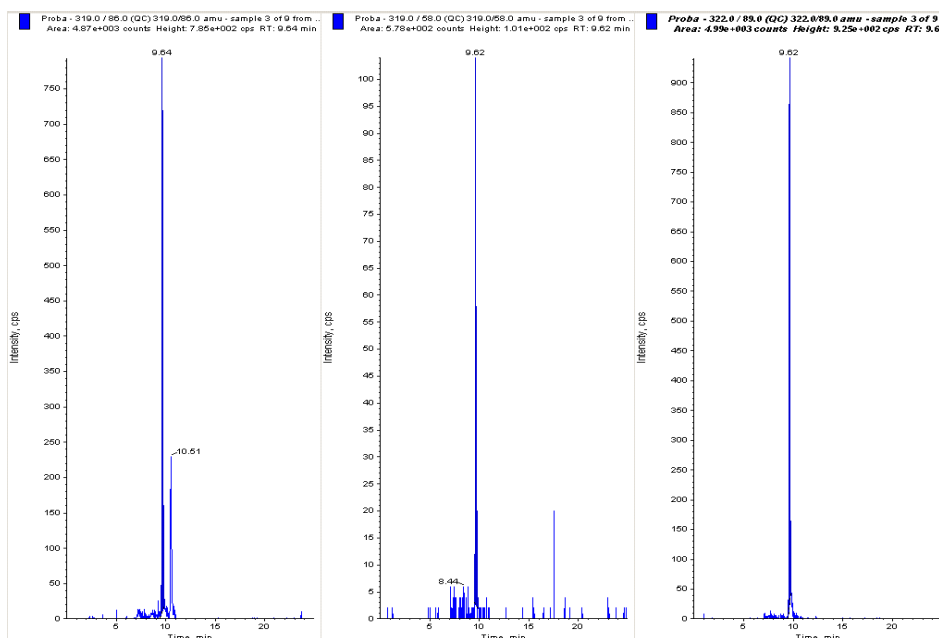
- posiadać minimum 4 punkt identyfikacyjne;
- stosunek sygnału do szumu dla każdego jonu diagnostycznego powinien wynosić $\geq 3:1$;
- względne natężenia jonów diagnostycznych muszą być w granicach tolerancji zawartej w tabeli 4 ww. decyzji [2].

Sprawdzano czy opracowana metoda oznaczania CP w nerkach i moczu zwierząt spełnia wymagane kryteria. Stwierdzono, że metoda posiada cztery punkty identyfikacyjne. Jon macierzysty m/z 319 daje po dwa jony pierwszej generacji m/z 86 i 58. Jon macierzysty daje 1 punkt identyfikacyjny, zaś jony potomne po 1,5 punktu każdy z osobna, co w sumie daje 4 punkty. Wykazano, że stosunek sygnału do szumu dla każdego przejścia jonów diagnostycznych metabolitów wynosił $\geq 3:1$. Obliczone względne natężenia jonów diagnostycz-

nych mieściły się w granicach 11- 16% przy dopuszczalnej tolerancji różnicy względnych natężeń $\pm 20\%$.

Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z wytycznymi zawartymi w decyzji Komisji nr 2002/657/WE [2]. Wyznaczono parametry walidacji metody takie jak: specyficzność, liniowość, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, poprawność (odzysk), odporność na niewielkie zmiany, limit decyzyjny ($CC\alpha$) i zdolność wykrywania ($CC\beta$).

Opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanego CP. Specyficzność metody zbadano przy użyciu próbek czystych wzorców chemicznych CP, ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), matryc nerki pochodzących od bydła i trzody, matryc moczu oraz matryc wzbogaconych. Na ryc.1 przedstawiono typowy chromatogram CPi CP-d3 próbki nerki trzody wzmocnionej na poziomie 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Ryc. 1. Chromatogram LC-ESI-MS/MS z ekstraktu nerki trzody, tryb prac MRM, wzmocnienie matrycy CP 5 ng/g.

Fig. 1. LC-ESI-MS/MS chromatograms of pig kidney extract, MRM mode, spiked matrix CP 5 ng/g

W celu określenia powtarzalności, odtwarzalności, poprawności wzbogacono próbki nerki CP na poziomie 0,0; 2,5; 5,0 i 7,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W tabeli II przedstawiono dla przykładu uzyskane parametry statystyczne oznaczania CP w nerkach trzody przy wzbogaceniu na poziomie MRPL 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Decyzja Komisji nr 2002/657/EC wprowadza do walidacji metod dwa nowe parametry: limit decyzyjny wartości granicznej ($CC\alpha$) i zdolności wykrywania ($CC\beta$). Służą one do jednoznacznej interpretacji wyników analiz pozostałości chemicznych. Parametry te zostały wyznaczone na podstawie krzywej kalibracji zgodnie z PN-ISO 11843-2 [7]. Wartości $CC\alpha$

Tabela II Statystyczna charakterystyka metody oznaczania CP w nerkach i moczu zwierząt
 Table II Statistical characteristics of the method for CP determination in animals kidney and urine

Matryca (nerka)	Bydło	Trzoda	Mocz	Poziom akceptacji
Wartość średnia (($\mu\text{g}/\text{kg}$))	5,33	4,73	4,91	
Odchylenie standardowe powtarzalności ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,314	0,267	0,483	
Współczynnik zmienności powtarzalności (%)	5,89	5,65	9,84	35
Średni odzysk (%)	106,5	94,6	98,2	50-120
Odchylenie standardowe odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,261	0,297	0,101	
Współczynnik zmienności odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej (%)	5,12	5,84	2,13	53
Decyzyjna wartość graniczna ($\text{CC}\alpha$) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,92	1,19	1,08	
Zdolność wykrycia ($\text{CC}\beta$) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2,24	2,87	2,61	

i $\text{CC}\beta$ rozstrzygają ze znanym prawdopodobieństwem czy w próbce znajduje się oznaczana CP, czy nie lub czy jej wartość przekracza wartość graniczną. Dla metody potwierdzającej oznaczania CP w nerkach i moczu wyniki są zgodne jeżeli są poniżej lub równe wartości $\text{CC}\alpha$ wyznaczonej dla poszczególnych matryc.

WNIOSKI

1. Przedstawiona metoda oznaczania jakościowego i ilościowego chloropromazyny w nerkach i moczu zwierząt rzeźnych przy zastosowaniu układu LC-MS/MS spełnia wymagania Decyzji Komisji nr 2002/657/WE.
2. Opracowana procedura jest stosowana w laboratoriach kontrolnych pozostałości tego związku w nerkach i moczu zwierząt rzeźnych.

L. Rodziewicz, I. Zawadzka

OZNACZANIA POZOSTAŁOŚCI CHLOROPROMAZYNY W NERKACH I MOCZU ZWIERZĄT METODĄ LC-MS/MS

Streszczenie

Chloropromazyna (CP) jest przedmiotem monitoringu w produktach pochodzenia zwierzęcego, dla której minimalna wymagana wartość graniczna wydajności metody analitycznej (MPRL) wynosi $5,0 \mu\text{g}/\text{kg}$. W pracy przedstawiono opracowaną metodę potwierdzającą oznaczania chloropromazyny w nerkach trzody i bydła oraz moczu przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS. Zhomogenizowane próbki nerek i moczu estrahowano acetonitrylem. Do wstępnego rozdziału CP stosowano kolumnę chromatograficzną Luna C18 o wymiarach $150 \times 2 \text{ mm}$ i prekolumnę. Do identyfikacji oraz oznaczania CP

stosowano układ LC-ESI-MS/MS. Metoda została zwalidowana zgodnie z kryteriami Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Odzysk dla poziomu CP wynoszącego 5,0 ng/g był w zakresie 84-102%. Limit decyzyjny (CC α) i zdolność wykrywania (CC β) CP wynosiły odpowiednio dla nerek 1,19 ng/g i 2,87 ng/g oraz dla moczu 1,08 ng/g i 2,61ng/g.

L. Rodziewicz, I. Zawadzka

DETERMINATION OF CHLOROPROMAZINE RESIDUES IN ANIMALS KIDNEY AND URINE USING LC-MS/MS METHOD

Summary

Chloropromazyna (CP) is subjected to monitoring food animals products, with a minimum required performance limit (MPRL) set 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Homogenized kidney and urine were extracted with acetonitrile. CP- d3 was used as internal standard. LC separation was done on Luna C18 150 x 2 mm, 5 μm column in mobile phase acetonitrile-acetic acid. CP was determination by LC-ESI-MS/MS negative mode. The method was validation according to the criteria of Decision Commission No 2002/657/EC. Recoveries for the level 5.0 ng/g were in the range 84 - 102 %. The limit of decision (CC α) and detection capability (CC β) CP in kidney were 1.19; 2.87 ng/g and urine 1.08; 2.61ng/g.

PIŚMIENNICTWO

1. *Balitz G., Hewitt A.*: Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003, 492, 105-131
2. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23 dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji.
3. *Delahaut P., Brasseur P., Dubois M.*: Multiresidue method for detection of tranquillisere, xylazine and a β -blocker in animal production by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1054, 373-378.
4. *Delahaut P., Brasseur P., Dubois M.*: Validation of a method for detection of tranquillisere, xylazine and a β -blocker in pig by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 335-340.
5. *Erzeń N.*: Analytical procedure for the determination of chloropromazine residue in muscle tissue and urine of food-producing animals. *Slov. Vet. Res.* 2001, 38, 297-304.
6. *Keukens H., Arets M.*: Determination of residues of carazolol and a number of tranquillizers in swine kidney by high- performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 1989, 464, 149-161.
7. PN-ISO 11843-2: 2003. Zdolność wykrywania – Cz.2: Metrologia w przypadku kalibracji liniowej.
8. *Quintana M., Blanco M., Lacal J.*: Analysis of promazines in bovine livers by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection. *Talanta* 2003, 59, 417-422
9. *Smyth W.*: Electrospray ionization mass spectrometric behaviour of selected drugs and their metabolites. *Anal. Chim. Acta* 2003, 492, 1-16.
10. *Stolker A., Brinkman U.*: Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. *J. Chromatogr. A.* 2005, 1067, 15-33.

Otrzymano: 30.11.2006 r.