

LECH RODZIEWICZ, IWONA ZAWADZKA

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI METABOLITÓW NITROFURANÓW W TKANKACH ZWIERZĄT METODĄ LC-MS/MS

DETERMINATION OF NITROFURAN METABOLITES 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@wiv.bianet.com.pl
Kierownik: dr L. Rodziewicz

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

Słowa kluczowe: metabolity nitrofuranów, oznaczanie pozostałości, tkanka mięśniowa, LC-MS/MS

Key words: nitrofuran metabolites, residue determination, meat, LC-MS/MS

WSTĘP

Pochodne 5-nitrofuranu (np. furazolidon, nitrofurantoina, nitrofurazon, furaltadon) stanowią grupę leków syntetycznych przeciwbakteryjnych szeroko stosowanych w lecznictwie weterynaryjnym. Działanie bakteriobójcze nitrofuranów dotyczy głównie zwalczania infekcji bakteryjnych dróg moczowych, przewodu pokarmowego oraz skóry u zwierząt. Obok działania farmakologicznego nitrofurany wywołują liczne efekty niepożądane takie jak: mutagenność, kancerogenność, hepatoksyczność, uszkodzenia płuc oraz mięśnia serowego [13]. Dlatego też nitrofurany zostały zakwalifikowane do grupy substancji A, co oznacza, że zostały skreślone z Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych Stosowanych Wyłącznie u Zwierząt. Mimo to istnieją podejrzenia, że nitrofurany mogą być nielegalnie wykorzystane w leczeniu zwierząt, których produkty przeznaczone są do spożycia [2, 6].

Badania w warunkach *in vivo* wykazały, że substancje macierzyste dość szybko ulegają przemianom metabolicznym, dlatego też do kontroli pozostałości nitrofuranów wykorzystano ich metabolity jako biomarkery pozostałości ze względu na ich długi półokres zaniku w organizmie zwierząt, który wynosi 4 – 9 dni [9]. Biomarkerem furazolidonu jest metabolit 3-amino-2-oksazolidynon (AOZ), nitrofurantoiny 1-aminohydantoina (AHD), nitrofurazonu semikarbazyd (SEM) oraz furaltadonu 5-morfolinometylo-3-amino-oksazolidynon (AMOZ) [2].

Wg Decyzji Komisji nr 2003/181/WE, która obowiązuje od 13 marca 2003 r. został wprowadzony MRPL (ang. *minimum required performance limit*) dla metabolitów nitrofuranów na poziomie 1,0 µg/kg dla mięsa, jaj, mleka, owoców morza (krewetki, kraby) oraz miodu [4]. Poziom ten jest bardzo niski, dlatego też analiza jakościowo-ilościowa musi być prowadzona przy użyciu wysokorozdzielczych, czułych i selektywnych technik analitycznych. Układy LC-UV i LC-MS nie spełniają warunku MRPL, gdyż granice wykrywalności podawane przez różnych autorów są wyższe od wymaganych [2, 3, 12]. Warunek ten spełniają metody, w których są stosowane układ LC-MS/MS. Zastosowanie tego układu pozwoliło na zwiększenie czułości 20 -100 razy względem LC-MS [7].

Wszystkie najnowsze dostępne w piśmiennictwie metody oznaczania metabolitów nitrofuranów w tkance mięśniowej zwierząt przy użyciu LC-MS/MS polegają na jednoczesnej hydrolizie kwasem solnym związanych z tkanką metabolitów i ich derywatywacji NBA. Zaletą hydrolizy i derywatywacji jest wzrost masy atomowej poszczególnych metabolitów z zakresu 75 – 201 do 208 – 334 g/mol. Jest to bardzo korzystne przy analizie LC-MS/MS (duża wydajności jonizacji, specyficzność fragmentacji). Wadą metody jest długi czas reakcji derywatywacji wynoszący ponad 15 godz. w temp. 37 °C [9]. Oczyszczanie i zateżanie otrzymanych ekstraktów prowadzono przeważnie metodą ciecz-ciecz (octan etylu) [2, 6, 8] oraz SPE (kolumnienki polimeryczne typu LiChlorut EN, Oasis MAX, Oasis HLB) [1, 9, 10].

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa i badań własnych opracowano metodę identyfikacji oraz oznaczania ilościowego metabolitów nitrofuranów w tkance mięśniowej pochodzącej od bydła, trzody, drobiu i ryb, która spełnia zalecenia decyzji Komisji nr 2003/181/WE i nr 2002/657/WE [5] przy użyciu układu LC- MS/MS. Wykorzystano ogólnie stosowane procedury (hydroliza kwasem solnym i derywatywacja NBA), którą zmodyfikowano głównie w odniesieniu do optymalizacji układu LC-MS/MS poprzez dobór odpowiedniej kolumny chromatograficznej, fazy ruchomej i parametrów pracy MS. Opracowana procedura jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości metabolitów nitrofuranów.

MATERIAŁ I METODY

Wyposażenie pomiarowe

Chromatograf cieczowy firmy Agilent 1100, spektrometr masowy API 3000 LC-MS/MS System, waga analityczna o dokładności ± 0,1 mg, waga laboratoryjna elektroniczna o

dokładności ± 0,01g, pH-metr, system oczyszczania wody Millipore, homogenizator laboratoryjny umożliwiający homogenizację tkanki, wirówka laboratoryjna, blok grzejny, wytrząsarka laboratoryjna.

Odczynniki i roztwory

Woda, przynajmniej o trzecim stopniu czystości, zgodnie z normą PN-ISO 3696:1999, metanol do HPLC, metanol cz.d.a., octan etylu cz.d.a., 2-nitrobenzaldehyd (NBA) roztwór 100 mM, fosforan trisodu ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) roztwór 0,3 M, kwas solny 0,1 M, wodorotlenek sodu 2 M, octan amonu 0,5 mM, substancje wzorcowe metabolitów 3-amino-2-oksazolidynon (AOZ), semikarbazyd (SEM), 5-morfolinometrylo-3-amino-oksazolidynon (AMAZ) (Sigma-Aldrich), 1-aminohydantoina (AHD) (Witega), substancje wzorcowe standardów wewnętrznych AOZ-d4, AMAZ-d5 (Sigma-Aldrich).

Przygotowanie próbek do analizy

Materiał do badań stanowiły próbki tkanki mięśniowej pochodzącej od bydła, trzody, drobiu i ryb. Do czasu analizy próbki były przechowywane w temp. poniżej -20 °C. Przed rozpoczęciem badania

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

Do zakręczanych próbek wirówkowych o pojemności 25 ml odważono po 1,0 g mięśni. Dodano po 0,1 ml standardu wewnętrznego będących mieszaniną AOZ-d4 i AMOZ-d5 każdy o stężeniu 0,1 µg/ml. Następnie dodano 9 ml roztworu kwasu solnego 0,1 M i 100 µl roztworu NBA 100 mM. Probówki szczelnie zakręcono, wymieszano i umieszczono w bloku grzejnym w temp. $37 \pm 1^\circ\text{C}$ na okres 16 h. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej dodano 1,0 ml roztworu fosforanu trisodu 0,3 M, wymieszano i doprowadzono do $\text{pH}=7 \pm 0,5$ roztworem wodorotlenku sodu 2 M. Dodano 4,0 ml octanu etylu i mieszano przez 20 min. Następnie wirowano przez 10 min przy szybkości ok. 3500 obr/min. Zebrano górną warstwę octanu etylu do czystej próbówki i powtórzono ekstrakcję kolejną 4,0 ml porcją octanu etylu. Połączone ekstrakty odparowano do sucha na bloku grzejnym w temp $45 \pm 5^\circ\text{C}$ w strumieniu azotu. Odparowane ekstrakty rozpuszczono w 0,5 ml fazy ruchomej A - metanol do LC-MS, B – 20:80 ($V_1 + V_2$) metanol do LC-MS i 0,5 mM octan amonu. Następnie całość dokładnie wymieszano, odwirowano i przesączono przez filtr membranowy 45 µm.

Krzywą kalibracji wykonano metodą wzorca wewnętrznego. W tym celu wykorzystano matrycę zęrową (próbki tkanek mięśniowych, w których nie stwierdzono pozostałości metabolitów nitrofuranów). Probki wzmocnione przygotowano na poziomach 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 µg/kg i poddano analizie.

Analiza LC-ESI-MS/MS

Do wstępnego rozdzielania metabolitów nitrofuranów zastosowano 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 są następujące: przepływ przez kolumnę 200 µl/min, temp. kolumny analitycznej 40 °C, objętość dozowana 30,0 µl, faza ruchoma A - metanol do LC-MS, B – 20:80 ($V_1 + V_2$) metanol do LC-MS i 0,5 mM octan amonu, gradient stężeń 0,0 – 9,5 min B 95%, 9,5 – 15 min B 0,0%, 15 – 15,5 min B 95% i 15,5 – 25 min B 95%.

Do identyfikacji i oznaczania ilościowego metabolitów nitrofuranów w mięśniach zwierząt stosowano układ ESI-MS/MS-CID. Zasada działania tego układu polega na wybraniu jonu macierzystego w pierwszym analizatorze metodą rozpylenia w elektrycznym (ESI), który jest poddawany wtórnej fragmentacji w drugim analizatorze przez kolizję z azotem (CID) dając jony potomne. Rozdzielenie wiązek jonów według wartości stosunku m/z prowadzono z zastosowaniem analizatora kwadrupolowego. Oznaczano pochodne metabolitów. Analizę próbek prowadzono w obecności dwóch standardów we-

Tabela I. Monitorowanie przejść MRM dla metabolitów nitrofuranów i standardów wewnętrznych
MRM transitions monitored for nitrofuran metabolites and internal standards

Metabolity nitrofuranów	Przejścia używane w analizie jakościowej (m/z)	Energia kolizyjne (eV)	Przejścia używane w analizie ilościowej (m/z)
AHD	249 → 134	15	249 → 134
	249 → 178	28	
AOZ	236 → 134	19	236 → 134
	236 → 192	19	
SEM	209 → 166	15	209 → 166
	209 → 192	25	
AMOZ	335 → 291	18	335 → 291
	335 → 262	24	
AOZ-d4		19	240 → 134
AMOZ-d5		18	340 → 296

wewnętrznych deutrowanych (IS) AOZ-d4 i AMOZ-d5, których sygnały leżą blisko oznaczanych analitów AOZ-d4 jest IS dla AOZ, AHD, SEM zaś AMOZ-d5 dla AMOZ. Identyfikacje i oznaczanie ilościowe metabolitów nitrofuranów prowadzono w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM - równoważnik SRM (ang. *metastable reaction monitoring*). Warunki analizy ESI/ MS/MS oznaczania metabolitów nitrofuranów są następujące: polaryzacja dodatnia, gaz kolizyjny azot, temperatura kapilary 350 °C, napięcie kapilary elektrospreju (ESI) 5500 V, tryb pracy MRM, czas przemiatania 100 ms.

W tabeli I przedstawiono przejścia m/z wykorzystywane w analizie jakościowej i ilościowej oraz energię kolizyjną.

WYNIKI I 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 powyższej decyzji Komisji.

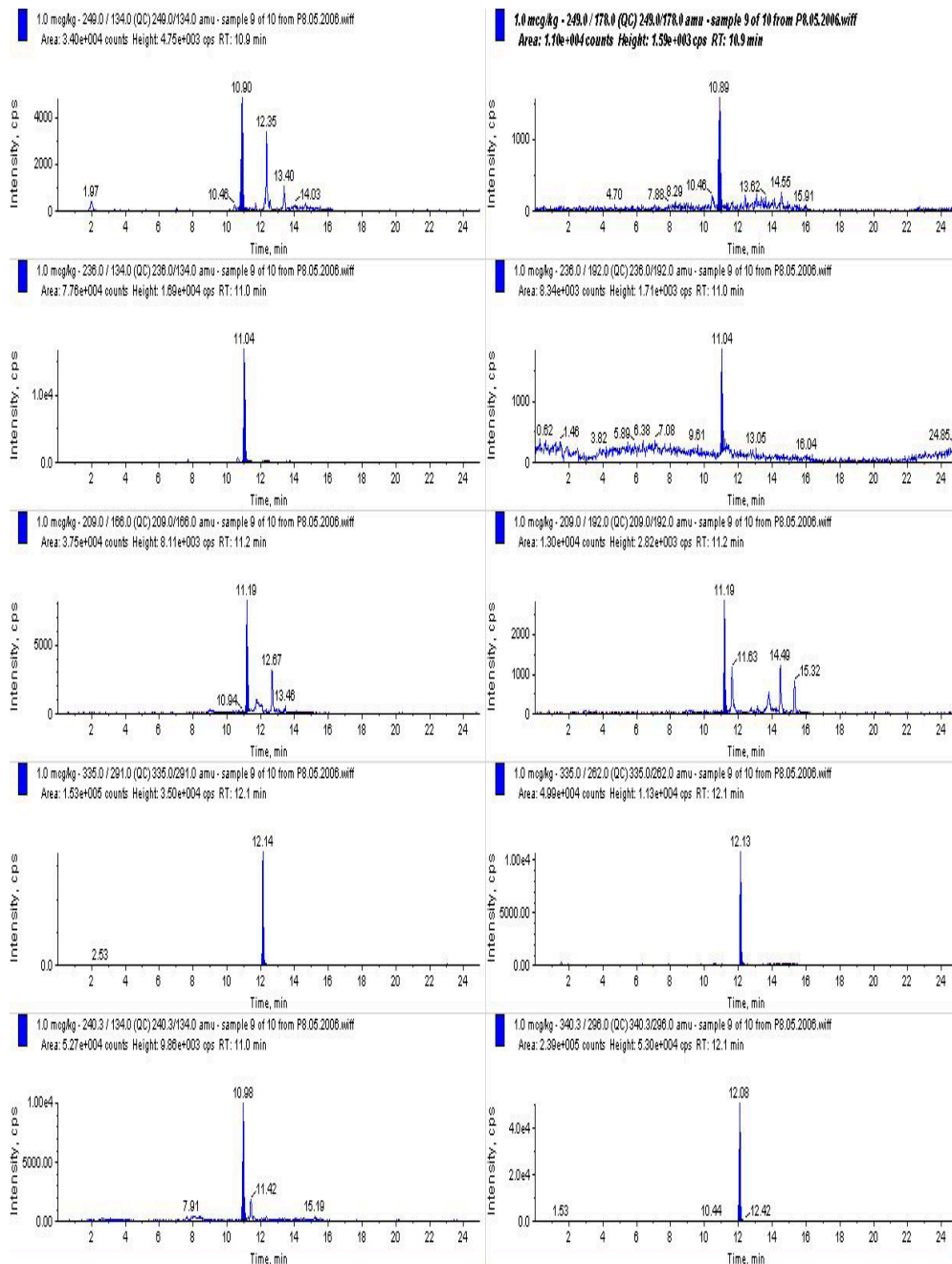
Sprawdzano czy opracowana metoda oznaczania pozostałości metabolitów w tkance mięśniowej zwierząt spełnia wymagane kryteria. Stwierdzono, że, metoda posiada cztery punkty identyfikacyjne (jon macierzysty każdego metabolitu nitrofuranów daje po dwa jony potomne - jon macierzysty daje 1 punkt identyfikacyjny, zaś jony potomne po 1,5 punktu każdy z

osobna). Wykazano, że stosunek sygnału do szumu dla każdego przejścia jonów diagnostycznych metabolitów wynosiło $\geq 3:1$. Obliczone względne natężenie jonów diagnostycznych mieściło się w granicach tolerancji. Dla AHD mieściło się w granicach 23 – 28 %, SEM 28 -36 % przy dopuszczalnej tolerancji różnicy względnych natężeń $\pm 25\%$ zaś AOZ 8 -11 % i A MOZ 30 -35 % przy dopuszczalnej różnicy $\pm 50\%$.

Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z zaleceniami zawartymi w decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Dla każdej matrycy wyznaczono następujące parametry statystyczne metody: specyficzność, liniowość, powtarzalność, dokładność, odtwarzalność oraz limit decyzyjny wartości granicznej $CC\alpha$ (granica wykrywalności) i zdolności wykrywania $CC\beta$ (granica oznaczania ilościowego).

Specyficzność metody zbadano przy użyciu próbek ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), matryc tkanek mięśniowych oraz matryc wzbogaconych pochodzących od bydła, trzody, drobiu i ryb. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanych metabolitów. Na rycinie 1 przedstawiono typowy chromatogram metabolitów nitrofuranów i standardów wewnętrznych próbki mięśni bydła wzmocnionej na poziomie 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Określono liniowość krzywej wzorcowej wykorzystując przejścia dla poszczególnych jonów o m/z metabolitów oraz odpowiedniego standardu wewnętrznego. Przyjęto, że zakres roboczy metody pokrywa się z zakresem liniowym, który wynosił 0,5 – 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Współczynnik korelacji krzywych wzorcowych wykonanych na próbkach wzmocnionych dla poszczególnych metabolitów wynosił $\geq 0,998$. W celu określenia powtarzalności, dokładności, odtwarzalności wzbogacono próbki mięśni bydła, trzody, drobiu oraz ryb metabolitami nitro-



Ryc. 1. Chromatogram LC-ESI-MS/MS z ekstraktu mięśni bydła, tryb pracy MRM, wzmocnienie matrycy tkanki mięśniowej metabolitami nitrofuranów 1,0 µg/kg.
 LC-ESI-MS/MS chromatograms of cattle muscle extract, MRM mode, spiked matrix meat tissue nitrofuran metabolites 1.0 µg/kg.

furanów na poziomie 0,5, 1,0 i 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W zależności od oznaczanego metabolitu i matrycy współczynnik zmienności powtarzalności przy wzmocnieniu na poziomie 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wynosił 5,7 – 20,2 %, zaś odtwarzalności 8,4 – 46,8 %. Średni odzysk wynosił 84,5 – 109,7 %. $\text{CC}\alpha$ i $\text{CC}\beta$ obliczono dla każdego metabolitu i matrycy na podstawie krzywych kalibracji wyznaczonych na podstawie próbek wzmocnionych zgodnie z PN-ISO 11843-2 [11]. $\text{CC}\alpha$ mieściła się w granicach 0,25 – 0,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$, zaś $\text{CC}\beta$ 0,32 – 0,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ przy MRPL wynoszącym 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

W tabeli II przedstawiono dla przykładu uzyskane parametry statystyczne metody oznaczania poszczególnych metabolitów w tkance mięśniowej bydła wzbogaconej na poziomie 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabela II. Statystyczna charakterystyka metody oznaczania metabolitów nitrofuranów w tkance mięśniowej bydła
Statistical characteristics of the method for nitrofuran metabolites determination in the cattle meat tissue

Metabolity	AOZ	AHD	SEM	AMOZ	Poziom akceptacji
Wartość średnia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,908	1,011	0,958	1,060	
Odchylenie standardowe powtarzalności ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,183	0,194	0,192	0,088	
Współczynnik zmienności powtarzalności (%)	20,2	19,1	20,0	8,3	35
Zakres odzysku (%)	57,5-108	65,2-118,0	69,0-116,0	92,7-120,0	50-120
Średni odzysk (%)	90,8	95,1	95,8	106,0	
Średni błąd względny (%)	-9,18	1,1	-4,2	6,0	-50 do +20
Odchylenie standardowe odtwarzalności ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,309	0,331	0,217	0,181	
Współczynnik zmienności odtwarzalności (%)	32,7	32,1	22,5	17,1	53
Decyzyjna wartość graniczna ($\text{CC}\alpha$)($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,250	0,250	0,300	0,260	
Zdolność wykrycia ($\text{CC}\beta$) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,320	0,320	0,380	0,330	

WNIOSKI

Przedstawiona metoda oznaczania jakościowego i ilościowego metabolitów nitrofuranów 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

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI METABOLITÓW NITROFURANÓW W TKANKACH ZWIERZĄT METODĄ LC-MS/MS

Streszczenie

Przedstawiono metodę LC-MS-MS oznaczania metabolitów nitrofuranu (furazolidonu, furaltadonu, nitofurantoiny i nitrofurazonu) w tkance mięśniowej zwierząt. Próbkę oczyszczano za pomocą ekstrakcji ciecz/ciecz stosując octan etylu po hydrolizie i derywatywacji 2-nitrobenzaldehydem. Metabolity nitrofuranu oznaczano przy użyciu układu LC-E SI-MS/MS z zastosowaniem kolumny Luna C18 Phenomenex. Faza ruchoma o gradiencie binarnym zawierała metanолоw y roztwór B składający się z 0,5 mM octanu amonu i metanolu (80:20 v/v). Metodę zwalidowano zgodnie z kryteriami Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Analizę próbek przeprowadzano w obecności dwóch standardów wewnętrznych AOZ-d4 i AMOZ-d5. Próbki fortyfikowano metabolitami nitrofuranu w zakresie: 0,5 – 2,0 µg/kg dla AOZ-d4 i AMOZ-d5. Średnie odzyski fortyfikowanych próbek mięsa na poziomie 1,0 µg/kg były w zakresie 84,5 – 109,7%. Decyzyjna wartość graniczna (CC α) mieściły się w zakresie 0,25 – 0,57 µg/kg, a zdolność wykrywania (CC β) w zakresie 0,32 – 0,77 µg/kg.

L. Rodziewicz, I. Zawadzka

DETERMINATION OF NITROFURAN METABOLITES RESIDUES IN ANIMAL TISSUE BY LC-MS/MS METHOD

Summary

A LC-MS-MS method is presented to analyze simultaneously the metabolites of four nitrofurans veterinary drugs in animal muscle tissue e.g., furazolidone, furaltadone, nitofurantoine and nitrofurazone. The sample clean up were performed by a liquid-liquid extraction with ethyl acetate, after a hydrolysis and derivatization with 2-nitrobenzaldehyde. Nitrofurane metabolites were determined by LC-E SI-MS/MS in positive mode. The LC was equipped with column Luna C18 Phenomenex. A binary gradient mobile phase was used as methanol solvent B containing 0.5 mM ammonium acetate and methanol (80:20 v/v). The method was validated according to criteria of Decision Commission No 2002/657/EC. Samples were fortified with metabolites of nitrofurans between 0.5 – 2.0 µg/kg with AOZ-d4, and AMOZ-d5 as internal standard. The mean recoveries from meat spiked at 1.0 µg/kg were 84.5 – 109.7%. Limit of decision (CC α) was between 0.25 – 0.57 and capability of detection (CC β) 0.32 – 0.77 µg/kg.

PIŚMIENNICWO

1. *Conneely A., Nugent A., Keefe M., Mulder P.*: Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 91-98.
2. *Cooper M., Kennedy D.*: Nitrofurans antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs-a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurans abuse. *Analyst* 2005, 130, 446-448.
3. *Corcia A., Nazzari M.*: Liquid chromatographic- mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A* 2002, 972, 53-89.

4. 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.
5. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23/EWG dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji.
6. *Finzi J., Donato J., Sucupira M.*: Determination of nitrofuran metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2005, 842, 30-35
7. *Hartig L., Czapiewski K.*: Detecting nitrofuran metabolites in animal products using LC/MS/MS. *Articale* 2005, 3. 21-23.
8. *Keeffe M., Conneely A., Cooper K.*: Nitrofuran antibiotic residues in pork The FoodBRAND retail survey. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 520, 125-131.
9. *Leitner A., Zollner P., Lindner W.*: Determination of the metabolites of nitrofuran antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A* 2001, 939, 49-58
10. *Mottier P., Khong S., Gremaud E.*: Quantitative determination of four nitrofuran metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2005, 842, 30-35.
11. PN-ISO 11843-2: Zdolność wykrywania – Cz.2: Metrologia w przypadku kalibracji liniowej. PKN, lipiec 2003, 19, 1-13.
12. *Stolker A., Brinkman U.*: Analytical strategies of residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *J. Chromatogr. A* 2005, 1067, 15-53.
13. *Szczyпка M.*: Właściwości genotoksyczne związków 5-nitrofuranowych. *Roczn. PZH* 1995, 46, 390-395.

Otrzymano: 2006.12.14