

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI AZAPERONU I KARAZOLOLU W NERKACH ZWIERZĄT METODĄ LC-MS/MS

DETERMINATION OF AZAPERONE AND CARAZOLOL RESIDUES IN ANIMALS KIDNEY USING LC-MS/MS METHOD

Iwona Zawadzka, Lech Rodziewicz

Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych, Zakład Higieny Weterynaryjnej,
Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, Białystok

Słowa kluczowe: azaperon, karazolol, oznaczanie pozostałości, nerka, LC-MS/MS

Key words: azaperone, carazolol, residues determination, kidney, LC-MS/MS

STRESZCZENIE

Przedstawiono metodę oznaczania azaperonu i karazololu w nerkach trzody. Próbkę była ekstrahowana acetonitrylem. Analizę przeprowadzono w układzie LC-ESI-MS/MS z zastosowaniem kolumny Luna C18 Phenomenex. Jako standard wewnętrzny zastosowano haloperidol. Metodę zwalidowano zgodnie z kryteriami Decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Średni odzysk próbek wzmocnionych na poziomie 100 µg/kg azaperonu i 25 µg/kg karazololu był w zakresie 91,2-107,0% i 70,8-93,2%. Limit decyzyjny (CC α) i zdolność wykrycia (CC β) wynosiły odpowiednio dla azaperonu 125,9 µg/kg, 160,0 µg/kg oraz karazololu 29,3 µg/kg, 33,3 µg/kg. Zastosowana technika LC-MS/MS spełnia wymagania Decyzji Komisji nr 2002/657/WE.

ABSTRACT

The method is presented to analyze azaperone and carazolol in pigs kidney. Samples were extracted with acetonitrile. The determination was performed by LC-ESI-MS/MS. The LC was equipped with column Luna C18 Phenomenex. Haloperidol was used as internal standards. The method was validation according to the criteria of Decision Commission No 2002/657/EC. Recoveries for the level 100 µg/kg azaperone and 25 µg/kg carazolol were in the range 91.2-107.0% and 70.8-93.2%. The limit of decision (CC α) and detection capability (CC β) was respectively 125.9 µg/kg, 160.0 µg/kg for azaperone and 29.3 µg/kg, 33.3 µg/kg. LC-MS/MS technique fulfill the requirements of Decision Commission No 2002/657/EC.

WSTĘP

Neuroleptyki i β -blokery są stosowane w leczeniu weterynaryjnym w celu złagodzenia stresu zwierząt związanego z załadunkiem oraz transportem do rzeźni. Powszechnie stosowanym neuroleptykiem była chlorpromazyna. Z uwagi na dużą toksyczność została ona skreślona z Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych stosowanych wyłącznie u zwierząt. Obecnie najczęściej stosowanymi neuroleptykiem jest azaperon, zaś z grupy β -blokerów karazolol. Leki te są podawane na kilka godzin przed ubojem. Niekontrolowane i nadmierne stosowanie azaperonu i karazololu powoduje biokumulację ich w organizmie zwierząt. Biorąc to pod uwagę leki te mogą przedostawać się z pożywieniem do organizmu

człowieka. Według decyzji Komisji nr 2002/657/WE obowiązującej od dnia 14 sierpnia 2002 r. azaperon i karazolol zostały zakwalifikowane do grupy B (leki weterynaryjne i zanieczyszczenia) czyli mają wyznaczoną maksymalną dopuszczalną pozostałość (ang. *maximum residue limit* - MRL) i mogą być stosowane w leczeniu weterynaryjnym [1]. Główną drogą wydalania azaperonu i karazololu u zwierząt jest mocz, co powoduje, że pozostałości tych związków oznacza się w nerkach zwierząt rzeźnych. MRL dla nerek trzody wynosi dla azaperonu 100 µg/kg i karazolol 25 µg/kg.

Decyzja Komisji nr 2002/657/WE wprowadza również rodzaje technik pomiaru jakie można stosować w metodach potwierdzających dla grupy B. Wśród metod instrumentalnych przy oznaczaniu pozostałości azaperonu i karazololu w produktach pochodzenia

Adres do korespondencji: Iwona Zawadzka, Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych,
Zakład Higieny Weterynaryjnej, Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, 15-959 Białystok, ul. Zwycięstwa 26a, tel. 085 65 10 229,
e-mail: zawadzka@wiw.bianet.com.pl

zwierzęcego są stosowane chromatografia cieczowa [2, 3] oraz chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [4-7]. Szczególne znaczenia dla zapewnienia jednoznacznej identyfikacji tych związków mają metody potwierdzające gdzie zastosowanie ma LC-MS/MS. Przekazują one bowiem informacje o strukturze chemicznej analitu.

Na ogół procedura przygotowywania próbek polega na ekstrakcji wstępnej, oczyszczaniu na kolumnkach SPE (Oasis HLB, C-8) lub kolumnach Biomatrix, zażęzaniu otrzymanego ekstraktu i analizie przy zastosowaniu LC-MS/MS z jonizacją przez elektrorozpylanie (ang. *electrospray ionisation* – ESI) lub chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *atmospheric pressure chemical ionization* – APCI). Identyfikacje i oznaczanie ilościowe prowadzone są w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM (ang. *metastable reaction monitoring*).

Celem pracy było opracowanie w oparciu o dane z piśmiennictwa oraz doświadczenie własne metody identyfikacji oraz ilościowego oznaczania azaperonu i karazololu w nerkach trzody przy zastosowaniu techniki LC-ESI-MS/MS, która spełniałaby zalecenia Decyzji Komisji nr 2002/657/WE.

MATERIAŁ I METODY

Material

Materiał do badań stanowiły próbki tkanki nerek pochodzące od trzody. Do czasu analizy próbki były przechowywane w temp. poniżej -20°C . Przed rozpoczęciem badania próbkę nerki doprowadzano do temperatury pokojowej.

Odczynniki

Substancja wzorcowa azaperonu (Dr. Ehrenstorfer), substancja wzorcowa karazololu (Dr. Ehrenstorfer), standard wewnętrzny haloperidol (TCI), metanol LC-MS, acetonitryl LC-MS, acetonitryl cz.d.a, kwas octowy lodowaty, woda przynajmniej o trzecim stopniu czystości, zgodnie z normą PN-EN ISO 3696:1999/A1:2004, filtry wirówkowe YM-10 (Millipore).

Roztwory wzorcowe

Roztwory podstawowe w metanolu o stężeniu $1,0\ \mu\text{g/ml}$ sporządzano przez rozpuszczenie 10 mg azaperonu i karazololu w metanolu. Standard wewnętrzny haloperidolu o stężeniu $5,0\ \text{ng/ml}$ sporządzono w metanolu. Roztwory podstawowe przechowywano w temperaturze poniżej -20°C .

Przygotowanie próbek

Próbkę tkanki nerek rozdrabniano przy użyciu masyzynki do mielenia mięsa. Odważano 5 g próbki do próbek wirówkowych o pojemności 100 ml. Do każdej próbki dodawano po $1,0\ \text{ng}$ standardu wewnętrznego oraz 20 ml acetonitrylu. Próbkę umieszczano w łaźni ultradźwiękowej i ekstrahowano przez 10 min. Następnie wirowano je przez 10 min przy szybkości 3500 obr/min w temperaturze 4°C . Pobierano po 2 ml uzyskanego ekstraktu do próbek o poj. 10ml i odparowywano do sucha w bloku grzejnym w temp. $45-50^{\circ}\text{C}$ w strumieniu azotu. Odparowane ekstrakty rozpuszczano w $1,0\ \text{ml}$ mieszaniny metanolu do HPLC z wodą 50:50 (V_1+V_2). W celu usunięcia białka całość dokładnie mieszano i przepuszczano przez filtry wirówkowe YM-10.

Krzywą wzorcową wykonano metodą wzorca wewnętrznego. W tym celu wykorzystano matrycę zerową (próbki tkanek nerek, w których nie stwierdzono pozostałości azaperonu i karazololu). Mierzono stosunek odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości azaperonu $m/z\ 328\rightarrow 165$ i karazololu $299\rightarrow 116$ do odpowiedzi na stałą ilość standardu wewnętrznego $376\rightarrow 165$. Stosunek tych odpowiedzi wykreśla krzywe wzorcowe względem ilości azaperonu i karazololu. Krzywe wzorcowe sporządzano w oparciu o próbki wzmocnione (minimum 5 punktów) na poziomie 0,0 - 200 $\mu\text{g/kg}$ dla azaperonu i 0.0 - 50 $\mu\text{g/kg}$ karazololu. Zawartość azaperonu i karazololu w próbce obliczano z krzywej wzorcowej.

Analiza LC-ESI-MS/MS

Do rozdzielania azaperonu i karazololu stosowano chromatograf cieczowy firmy Agilent 1100 wyposażony w pompę binarną oraz analityczną kolumnę chromatograficzną Luna C18 (2) ($150 \times 2\ \text{mm}$, wielkość ziarna $3\ \mu\text{m}$) (Phenomenex, Torrance, USA) wraz z prekolumną o tym samym wypełnieniu. Warunki analizy LC:

Tabela 1. Monitorowanie przejścia MRM azaperonu i karazololu oraz standardu wewnętrznego haloperidolu
MRM transitions monitored for azaperone and carazolol and internal standard haloperidol

Oznaczany związek	Przejścia MRM (m/z)	Energia kolizyjna (eV)	Względne natężenie jonów \pm tolerancja (%)
Azaperon	328 \rightarrow 165*	29	73 \pm 20
	328 \rightarrow 121	29	
Karazolol	299 \rightarrow 116*	20	29 \pm 25
	299 \rightarrow 222	20	
Haloperidol (IS)	376 \rightarrow 165*	37	

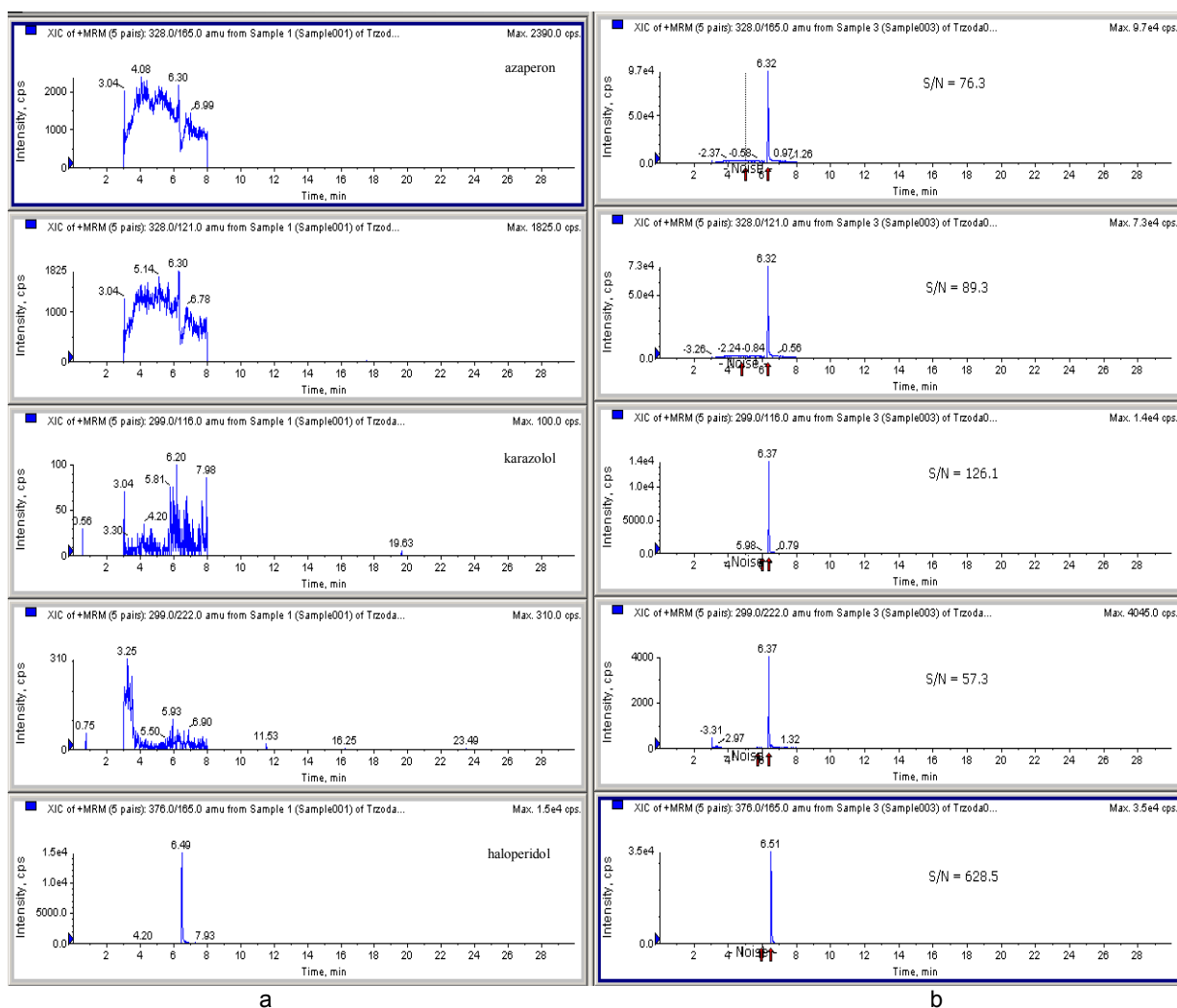
* przejścia używane w analizie ilościowej

przepływ przez kolumnę 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, temp. kolumny 25°C, dozowana objętość 10 μl , faza ruchoma A – metanol do LC-MS, B– 0,05% kwas octowy, gradient stężeń 0,0–3,0 min B 100; 3,0–12,0 min B 0,0%; 12–12,3 min B 100% i 12,3–30 min B 100%.

Do identyfikacji i oznaczania ilościowego azaperonu i karazololu w nerkach trzody stosowano spektrometr mas API 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Canada) sprzężony z chromatografem ciekowym (układ LC-ESI-MS-MS) oraz zawór odcinający (Valco instrument Co. Inc., Huston, TX, USA). Warunki analizy ESI-MS-MS: polaryzacja dodatnia, gaz kolizyjny azot, energia kolizyjna 20 eV, temperatura kapilary 450°C, napięcie kapilary elektrospreju (ESI) 4500V, tryb pracy MRM, czas przemiatania 150 ms. Identyfikację i oznaczanie ilościowe azaperonu i karazololu prowadzono w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów metastabilnych MRM. W tabeli 1 przedstawiono przejścia MRM oraz ich energię kolizyjną.

WYNIKI I DYSKUSJA

W procesie walidacji sprawdzono czy opracowana metoda oznaczania pozostałości neuroleptyków i β -blokerów w tkance nerek spełnia kryteria zawarte w decyzji Komisji nr 2002/657/WE stawiane metodom potwierdzającym przy zastosowaniu układu LC-MS/MS niskiej rozdzielczości. Według ww. decyzji Komisji opracowana metoda powinna posiadać minimum trzy punkty identyfikacyjne, stosunek sygnału do szumu dla każdego jonu diagnostycznego musi wynosić $\geq 3:1$ oraz względne natężenie jonów diagnostycznych (% pola powierzchni piku pola jonu macierzystego) powinno znajdować się w granicach tolerancji. Stwierdzono, że metoda posiada cztery punkty identyfikacyjne. Jonom macierzystym oznaczanych analitów przypisywany jest 1 punkt zaś jonom potomnym pierwszej generacji 1,5 punktu. Zarówno w przypadku azaperonu jak i karazololu mamy jon macierzysty (azaperon 328 m/z, karazolol 299 m/z) i dwa jony potomne pierwszej ge-



Ryc. 1. Chromatogram MRM z ekstraktu nerki trzody - matryca (a) i próbka wzmocniona na poziomie 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ azaperonu; 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ karazololu (b)
MRM Chromatograms of pig kidney extract matrix (a) and spiked sample at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ azaperone; 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ carazolol (b)

neracji (azaperon 165,121 m/z, karazolol 116, 122 m/z) czyli w sumie 4 punkty. Stosunek sygnału do szumu dla każdego przejścia jest ≥ 3 . Na rycinie 1 przedstawiono MRM chromatogramu matrycy i próbki nerki trzody wzmocnionej azaperonem na poziomie 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i karazololem na poziomie 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Obliczone względne natężenie jonów diagnostycznych mieściło się w granicach tolerancji. Dla azaperonu było ono w granicach 68-84 %, zaś dla karazololu 24-35 %. Średnie względne natężenie jonów oraz dopuszczalne tolerancje podano w tabeli 1.

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, powtarzalności, poprawność (odzysk), dokładność (błąd względny), odtwarzalności 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 nerek oraz matryc wzbogaconych pochodzących od trzody. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanych związków.

Określono liniowość krzywej wzorcowej wykorzystując przejścia dla poszczególnych jonów o m/z azaperonu i karazololu oraz standardu wewnętrznego haloperidolu. Współczynnik korelacji krzywych wzorcowych wykonanych na próbkach wzmocnionych dla poszczególnych związków wynosił $\geq 0,998$.

Według decyzji Komisji nr 2002/657/WE powtarzalność, poprawność oraz odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna została obliczona na podstawie próbek wzbogaconych na poziomie 0,5, 1,0 i 1,5-krotności dopuszczalnego MRL co odpowiada 50, 100, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla azaperonu i 12,5, 25, 37,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla karazololu. Powtarzalność, poprawność oraz dokładność została obliczona na podstawie analizy próbek wykonanych na tym samym przyrządzie pomiarowym i przez tego samego operatora.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna została wykonana w trzech różnych dniach na tym samym

przyrządzie pomiarowy przez różnych operatorów. $CC\alpha$ i $CC\beta$ obliczono na podstawie krzywych kalibracji wyznaczonych na podstawie próbek wzmocnionych zgodnie z PN-ISO 11843-2 [8]. Obliczone współczynniki zmienności powtarzalności (CV%) były niższe od 12,8 % dla azaperonu przy wzmocnieniu od 50 do 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i 14,2 %, dla karazololu przy wzmocnieniu w zakresie 12,5 - 37,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Współczynniki zmienności odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej były poniżej 16,1 % dla azaperonu i 18,5 % dla karazololu. Średni odzysk mieścił się dla azaperonu w zakresie 94,7 - 101,4 %, a dla karazololu 83,2 - 88,0 %.

Uzyskane parametry statystyczne metody oznaczania azaperonu i karazololu w nerkach na poziomie MRL 100 i 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ przedstawiono w tabeli 2.

Opracowana metoda oznaczania azaperonu i karazololu w nerkach trzody spełnia postanowienia decyzji Komisji nr 2002/657/WE.

WNIOSKI

Przedstawiona metoda identyfikacji i oznaczania azaperonu i karazololu w nerkach trzody przy zastosowaniu układu LC-ESI-MS-MS spełnia wymagania zawarte w decyzji Komisji nr 2002/657/WE i jest odpowiednia do stosowania w badaniach kontrolnych pozostałości tych związków w nerkach trzody.

PIŚMIENNICTWO

1. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. nr 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23 dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji.
2. *Cerkvenik-Flajs V.*: Determination of residues of azaperone in kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 374-382.
3. *Rudolph M., Steinhart H.*: Determination of carazolol in tissue of pigs by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1987, 392, 371-378.
4. *Delahaut Ph., Brasseur P., Dubois M.*: Multiresidue method for tranquillisers, xylazine, and a β -blocker in

Tabela 2. Statystyczna charakterystyka metody oznaczania azaperonu i karazololu w nerkach trzody
Statistical characteristics of the method for azaperone and carazolol determination in the pig kidneys

Parametr	Azaperon	Karazolol	Poziom akceptacji
Poziom wzmocnienia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	100	25	
Wartość średnia ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	97,7	20,7	
Współczynnik zmienności powtarzalności (%)	10,4	10,2	20
Średni błąd względny	-2,3	-17,4	-20 do +10
Zakres odzysku (%)	91,2 - 107,0	70,8 - 93,2	
Średni odzysk (%)	101,4	83,2	60 - 120
Współczynnik zmienności odtwarzalności (%)	15,8	13,9	
Limit decyzyjny $CC\alpha$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	125,9	29,3	
Zdolność wykrycia $CC\beta$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	160,0	33,3	

- animal production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1054, 373-378.
5. *Delahaut Ph., Levaux C., Eloy C.*: Validation of a method for detecting and quantifying tranquillisers and a β -blocker in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 335-340.
 6. *Fluchard D. Kiebooms S. Dubois M.*: Determination of a method for detecting and quantifying azaperone, azaperol and carazolol in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2006, 744, 139-147.
 7. *Govaert Y., Batjoens P., Tsilikas K.*: Multi-residue analysis of tranquillizers in meat: confirmatory assays using mass spectrometry. *Analyst* 1998, 123, 2507-2512.
 8. PN-ISO 11843-2: Zdolność wykrywania – Cz. 2: Metrologia w przypadku kalibracji liniowej. PKN, lipiec 2003, 19, 1-13.
- Otrzymano: 01.04.2008
Zaakceptowano do druku: 22.12.2008

