

# ZASTOSOWANIE POLIMERÓW Z ODWZOROWANIEM CZĄSTECZKOWYM DO OZNACZANIA POZOSTAŁOŚCI CHLORAMFENIKOLU W MLEKU W PROSZKU METODĄ LC-MS/MS

## DETERMINATION OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN MILK POWDER USING MOLECULAR IMPRINTED POLYMERS (MIP) BY LC-MS/MS

*Lech Rodziewicz, Iwona Zawadzka*

Zakład Higieny Weterynaryjnej  
Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, Białystok

**Słowa kluczowe:** chloramfenikol, polimery z odwzorowaniem cząsteczkowym, pozostałości, mleko w proszku, LC-MS/MS  
**Key words:** chloramphenicol, molecularly imprinted polymers, residues, milk powder, LC-MS/MS

### STRESZCZENIE

Przedstawiono metodę oznaczania chloramfenikolu w mleku proszku. Próbkę były oczyszczane przy zastosowaniu polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym (MIP). Analizę przeprowadzono w układzie LC-ESI-MS/MS z zastosowaniem kolumny Luna C18 Phenomenex. Jako standard wewnętrzny zastosowano CAP-d5. Metodę zwalidowano zgodnie z kryteriami decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Średni odzysk próbek wzmocnionych na poziomie 0,3 µg/kg mieścił się w zakresie 104-111%. Limit decyzyjny (CCα) i zdolność wykrywania (CCβ) wynosiły odpowiednio 0,06 µg/kg i 0,09 µg/kg.

### ABSTRACT

The method is presented to analyze chloramphenicol in milk powder. Sample was clean-up by used molecular imprinted polymers (MIP). The determination was performed by LC-ESI-MS/MS. The LC was equipped with column Luna C18 Phenomenex. CAP-d5 was used as internal standards. The method was validation according to the criteria of Decision Commission No 2002/657/EC. Recoveries for the level 0.3 µg/kg was in the range 104-111%. The limit of decision (CCα) and detection capability (CCβ) was respectively 0.06 µg/kg and 0.09 µg/kg.

### WSTĘP

Chloramfenikol (CAP) jest jednym z najstarszych antybiotyków, który wykazuje szeroki zakres działania bakteriostatycznego. Obok cennego działania farmakologicznego CAP może wywoływać niezwykle groźną dla życia ludzi niedokrwistość aplastyczną. Objawy chorobowe u osób nadwrażliwych mogą wystąpić po przyjęciu CAP nawet w stosunkowo niewielkich dawkach nieszkodliwych dla ogółu populacji. Z tego powodu CAP został zakwalifikowany do grupy substancji A, co oznacza, że skreślono go z Rejestru Środków Farmaceutycznych i Materiałów Medycznych stosowanych wyłącznie u zwierząt. Niedozwolone jest stosowanie CAP jako środka w leczeniu tych zwierząt, których produkty przeznaczone są do spożycia. Mimo

to istnieją podejrzenia, że CAP może być nielegalnie wykorzystywany w leczeniu zwierząt.

Potwierdzającym metodom ilościowym stosowanym w analizie CAP stawia się wysokie wymagania analityczne. Określono minimalne wymagania wartości granicznej wydajności metod analitycznych MRPL (ang. *minimum required performance limit*) stosowanych do oznaczania CAP w produktach pochodzenia zwierzęcego. Wg decyzji Komisji nr 2003/181/WE, która obowiązuje od 13 marca 2003 r. MRPL został wprowadzony dla CAP na poziomie 0,3 µg/kg dla mięsa, jaj, mleka, owoców morza (krewetki, kraby) i miodu [2]. Warunek ten spełniają metody, w których są stosowane układy LC-MS/MS. Mało jest prac dotyczących oznaczania CAP w mleku w proszku metodą LC-MS/MS [4, 6].

**Adres do korespondencji:** Lech Rodziewicz, Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych, Zakład Higieny Weterynaryjnej, Wojewódzki Inspektorat Weterynarii, 15-959 Białystok, ul. Zwycięstwa 26A, tel. 85 65 10 229, fax: 85 65 16 291, e-mail: rodziewicz@wiw.bianet.com.pl

Procedura przygotowania próbek mleka sproszkowanego do MS polega na rozpuszczeniu go w wodzie, oczyszczeniu i zateżnieniu otrzymanego ekstraktu z wykorzystaniem metody ciecz-ciecz (octan etylu) [6] lub SPE (kolumnienki polimeryczne Oasis HLB) [4].

Wśród nowych technik stosowanych do oczyszczania próbek na uwagę zasługuje metoda ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentów z odwzorowaniem cząsteczkowym (ang. *Molecularly Imprinted Polymers* – MIP). Ten rodzaj sorbentów określany jest często mianem sztucznych przeciwciał z uwagi na dużą selektywność sorbentu w stosunku do określonych analitów podobnie jak ma to miejsce w przypadku immunosorbentów. Zasada tworzenia MIP polega na zabudowaniu polimerem przestrzeni wokół cząsteczek substancji wzorca, na który chce się uwrażliwić materiał. Łańcuchy obudowujące cząsteczkę wzorca oddają w ten sposób jego wielkość i kształt. Tworzą kompleksy monomery-cząsteczki wzorca, które zostają unieruchomione w polimerze. Z chwilą, usunięcia cząstek wzorca z matrycy, powstają wolne przestrzenie, które dopasowane są do oznaczanej substancji rozmiarem, kształtem oraz właściwościami. Dzięki temu stają się one dostępne jedynie dla cząsteczek podobnych lub wręcz identycznych ze wzorcem. Grupy funkcyjne odcisków molekularnych stanowią zatem kluczowy element ułatwiający rozpoznawanie wybranych cząsteczek. W zależności od potrzeb w polimerze można utrwalić odciski molekularne różnych cząsteczek wzorców, co pozwala otrzymać specyficzne polimery selektywnie je rozróżniające [1, 7, 8]. W chwili obecnej są dostępne w handlu kolumnienki SPE MIP firmy Supelco do oznaczania w różnych matrycach biologicznych następujących leków: chloramfenikol, *beta*-agoniści oraz *beta*-blokery.

Celem pracy było opracowanie, w oparciu o dane z piśmiennictwa oraz doświadczenia własne, metody identyfikacji oraz ilościowego oznaczania CAP w mleku w proszku metodą LC-ESI-MS/MS. Opracowana metoda powinna spełniać zalecenia decyzji Komisji nr 2003/181/WE i 2002/657/WE [2, 3].

## MATERIAŁ I METODY

### Odczynniki

Standard chloramfenikolu firmy Sigma-Aldrich (<99%). Standard wewnętrzny chloramfenikol-d5 (roztwór 100 µg/ml w acetonitrylu) firmy Cambridge Isotope Laboratories (Catalogue No. FSD-117-100, 98%). Kolumnienki SupelMIP SPE – Chloramfenikol 25 mg (Catalogue No. 53210-U) firmy Supelco, acetonitryl LC-MS, acetonitryl, metanol, octan etylu, dichlorometan do analiz firmy Baker, kwas octowy, amoniak do analiz firmy Merck.

### Roztwory wzorcowe

Roztwór podstawowy o stężeniu 1,0 µg/ml sporządzano przez rozpuszczenie 10 mg CAP w acetonitrylu. Standard wewnętrzny CAP-d5 (IS) o stężeniu 3,0 ng/ml sporządzono w acetonitrylu. Roztwory podstawowe przechowywano w temp. poniżej -20°C.

### Przygotowanie próbki do analizy

Do kolbki stożkowej o poj. 100 ml odważono po 5,0±0,1 g próbki. Następnie dodano 0,5 ml standardu wewnętrznego oraz 20 ml wody o temp. ok. 40°C całość mieszano aż do całkowitego rozpuszczenia mleka. Do próbek wirówkowych o pojemności 25 ml odważono po 3±0,1 g rozpuszczonej, wystudzonej próbki. Następnie dodano 3,0 g siarczanu sodu i 6,0 ml octanu etylu, wytrząsano przez 2 min. Próbkę wirowano przez 10 min przy szybkości ok. 3000 obr/min. Pobrano 4,0 ml uzyskanego ekstraktu i odparowano do sucha na bloku grzejnym w temp. 45 - 50°C w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 1,0 ml acetonitrylu dodano 1,0 ml heksanu, dokładnie wymieszano i pozostawiono do rozdziału faz. Ściągnięto warstwę heksanowi i powtórzono oczyszczanie kolejną porcją heksanu. Warstwę heksanową odrzucono. Dolną warstwę odparowano do sucha na bloku grzejnym w temp 45 - 50°C w strumieniu azotu. Odparowane ekstrakty rozpuszczono w 2,0 ml wody i nanoszono na kolumnienki SupelMIP SPE kondycjonowane 1 ml metanolu, a następnie 1 ml wody. Kolumnienki przemywano kolejno 2x1 ml wody, 1 ml 5% acetonitrylu w 0,5% kwasie octowym, 2x1 ml wody, 1 ml 20% roztworu acetonitrylu w 1% roztworze amoniaku. Kolumnienki suszono przez 5 min przy zastosowaniu próżni i następnie przemywano 3x1 ml dichlorometanu. Kolumnienki suszono przez 1 min. i eluowano 2x1 ml mieszaniny metanol: kwas octowy: woda (89:1:10, v/v/v). Próbkę odparowywano na bloku grzejnym w temperaturze 45-50°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 250 µl fazy ruchomej 0,05% kwas octowy - acetonitryl (80:20, v/v).

Krzywą wzorcową wykonano metodą wzorca wewnętrznego. W tym celu wykorzystano matrycę zerową ( próbki mleka w proszku, w których nie stwierdzono pozostałości CAP).

Mierzono stosunek odpowiedzi spektrometru mas na różne ilości CAP m/z 321→152 do odpowiedzi na stałą ilość standardu wewnętrznego 326→157. Stosunek tych odpowiedzi wykreśla krzywą wzorcową względem ilości CAP. Krzywą wzorcową sporządzano w oparciu o próbki wzmocnione (minimum 5 punktów) na poziomie 0,0-1,0 µg/kg. Zawartość CAP w próbce obliczano z krzywej wzorcowej.

### Analiza LC-ESI-MS/MS

Do oznaczania CAP stosowano chromatograf cieczowy firmy Agilent 1100 wyposażony w pompę

binarną oraz analityczną kolumnę chromatograficzną Luna C18 (2) (150 x 2 mm, wielkość ziarna 3  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, USA) wraz z prekolumną o tym samym wypełnieniu. Warunki analizy LC: przepływ przez kolumnę 200  $\mu\text{l}/\text{min}$ , temp. kolumny 40°C, dozowana objętość 20  $\mu\text{l}$ , faza ruchoma A-0.05% kwas octowy, B-acetonitryl (80:20; v/v), gradient stężeń: 0.0-0.1 min 80% A; 0.1-15.0 min 0.0% A; 15-15.30 min 80% A; 15.30-25.0 min 20% A. Do oznaczania CAP stosowano spektrometr mas API 3000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Canada) sprzężony z chromatografem cieczowym (układ LC-ESI-MS-MS) oraz zawór odcinający (Valco instrument Co. Inc., Huston, TX, USA). Warunki analizy ESI-MS-MS: polaryzacja ujemna, gaz kolizyjny azot, temperatura kapilary 350°C, napięcie kapilary elektrospreju (ESI) -3500 V, tryb pracy MRM (monitorowania wybranych reakcji), czas przemiatania 150 ms. Monitorowano przejścia 321→152 (18eV), 321→257 (14eV) i 326→157 (IS) (23eV). W nawiasie podano ich energie kolizyjne.

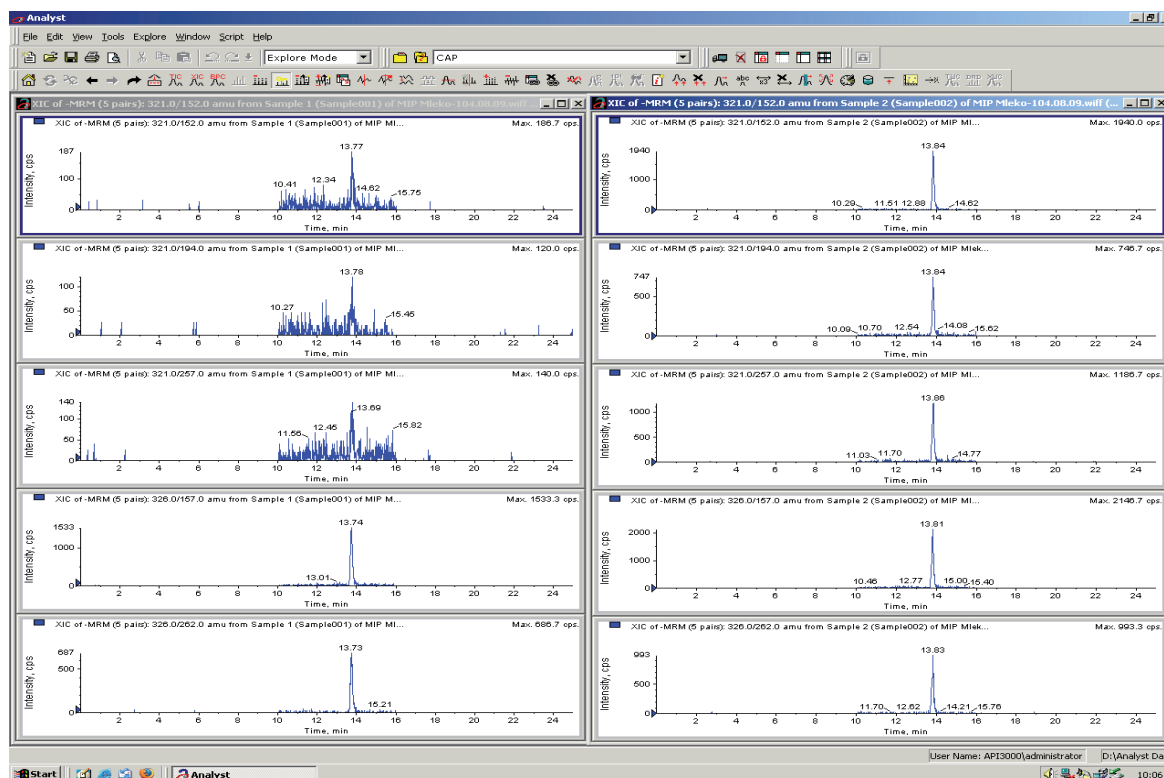
## WYNIKI I DYSKUSJA

W procesie walidacji sprawdzono czy wybrana metoda oznaczania pozostałości CAP w mleku w proszku spełnia kryteria zawarte w decyzji Komisji nr 2002/657/WE stawiane metodom potwierdzającym przy zastosowaniu układu LC-MS/MS niskiej rozdzielczości. Według

ww. decyzji opracowana metoda powinna posiadać minimum trzy punkty identyfikacyjne, stosunek sygnału do szumu dla każdego jonu diagnostycznego musi wynosić  $\geq 3:1$  zaś 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. W przypadku CAP mamy jon macierzysty o m/z 321 i dwa jony potomne pierwszej generacji o m/z 152 i 257 co daje w sumie 4 punkty. Stosunek sygnału do szumu dla każdego przejścia jest  $\geq 3$ . Obliczone średnie względne natężenie jonów diagnostycznych mieściło się w granicach tolerancji i było  $68 \pm 20$  dla przejścia m/z 321→257. Na rycinie 1 przedstawiono MRM chromatograf matrycy i próbki mleka w proszku wzmocnionej CAP na poziomie 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Przedstawiono również dodatkowe przejścia m/z 321→194 i 326→262 (IS), które mogą być wykorzystywane w analizie.

Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z zaleceniami zawartymi w decyzji Komisji nr 2002/657/WE. Wyznaczono dla każdej matrycy następujące parametry statystyczne metody: specyficzność, liniowość, powtarzalności, poprawność (odzysk), dokładność (błąd względny), odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjną oraz limit decyzyjny wartości granicznej ( $CC\alpha$ ) i zdolności wykrycia ( $CC\beta$ ).



Ryc. 1 Chromatogram MRM z ekstraktu mleka proszku - matryca (a) i próbka wzmocniona na poziomie 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  CAP (b)  
MRM chromatograms of milk powder extract - matrix (a) and spiked sample at 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  CAP (b)

Specyficzność metody zbadano przy użyciu próbek ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), matryc oraz matryc wzbogaconych pochodzących od mleka w proszku. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanych związków.

Określono liniowość krzywej wzorcowej wykorzystując przejścia dla poszczególnych jonów o m/z CAP oraz standardu wewnętrznego CAP-d5. Współczynnik korelacji krzywych wzorcowych wykonanych na próbkach wzmocnionych w zakresie 0,1-1,0 µg/kg wyniósł  $\leq 0,998$ .

Według decyzji Komisji Europejskiej nr 2002/657/WE [3] powtarzalność, poprawność oraz odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna została obliczona na podstawie próbek wzbogaconych na poziomie 1,0 1,5 i 2-krotności dopuszczalnego MRPL co odpowiada 0,3; 0,45, 0,60 µg/kg. Powtarzalność, poprawność oraz dokładność zostały obliczone 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 [5].

W tabeli 1 przedstawiono uzyskane parametry statystyczne metody oznaczania CAP w mleku w proszku.

Tabela 1. Statystyczna charakterystyka metody oznaczania CAP w mleku proszku

Statistical characteristics of the method for CAP determination in milk powder

Poziom wzmocnienia (µg/kg)	0,30	0,45	0,60	Poziom akceptacji
Wartość średnia (µg/kg)	0,312	0,454	0,657	
CV <sub>r</sub> (%)	9,6	10,1	11,7	35
Średni błąd względny (RF%)	5,2	5,4	9,2	-20÷10
Średni odzysk (%)	104	106	111	50÷120
CV <sub>R</sub> (%)	10,1	11,5	12,8	
Limit decyzyjny CC $\alpha$ (µg/kg)	0,06			
Zdolności wykrycia CC $\beta$ (µg/kg)	0,09			

Obliczone współczynniki zmienności powtarzalności (CV<sub>r</sub>%) były niższe od 9,2 % Współczynniki zmienności odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej (CV<sub>R</sub>%) były poniżej 12,8 %. Zgodnie z decyzją nr 2002/657/WE dopuszczalna wartość współczynnik CV<sub>R</sub> nie może być obliczona z równania *Horwitza*. Wzmocnienie pró-

bek poniżej poziomu 100 µg/kg daje wysokie wartości CV<sub>R</sub>, które są niemożliwe do zaakceptowania. Dlatego też wartość CV<sub>R</sub> musi być najniższa jaką można uzyskać w badaniach wewnątrzlaboratoryjnych. Średni odzysk mieścił się w zakresie 104-111%.

## WNIOSKI

Przedstawiona metoda oznaczania jakościowego i ilościowego CAP w mleku w proszku przy zastosowaniu do oczyszczania kolumnienek SupelMIP SPE – Chloramfenikol oraz techniki LC-ESI-MS-MS spełnia wymagania decyzji Komisji nr 2002/657/WE i 2003/181/WE. Opracowana procedura jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości CAP w mleku w proszku.

## PISMIENNICTWO

1. *Boyd B., Björk H., Billing J.*: Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1174, 63-71.
2. 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.
3. Decyzja Komisji z dnia 14 sierpnia 2002 r. 2002/657/WE wykonująca dyrektywę Rady 96/23 dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji.
4. *Guy P., Royer D., Mottier P.*: Quantitative of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1054 365-371.
5. PN-ISO 11843-2: Zdolność wykrywania – Cz.2: Metrologia w przypadku kalibracji liniowej. PKN, lipiec 2003, 19, 1-13.
6. *Rodziewicz L., Zawadzka I.*: Rapid determination of residues in milk powder by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2008, 75, 846-850.
7. *Schirmer C., Meisel H.*: Molecularly imprinted polymers for selective solid-phase extraction of chloramphenicol. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 392, 223-229.
8. *Tamayo F., Turiel E., Martin-Esteban A.*: Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr.* 2007, 1152, 32-40.

Otrzymano: 07.09.2009

Zaakceptowano do druku: 12.04.2010