

DOLOČANJE OSTANKOV POMIRJEVAL

Jožica Dolenc*, Mitja Bukovec, Andrejka Močnik, Ksenija Šinigoj Gačnik, Zlatka Bajc

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

jozica.dolenc@vf.uni-lj.si

Pomirjevala se uporabljajo v veterinarski medicini. Pri rejnih živalih majhni odmerki zmanjšujejo agresivnost živali in ugodno vplivajo na težo. Posebno prašiči so občutljivi na stres, ki lahko vpliva tudi na kakovost njihovega mesa.

Razvoj analitske tehnike je prinesel velike spremembe v načinu določanja ostankov veterinarskih zdravil. Obstoječe metode nadomeščamo z novimi, ki omogočajo hitrejšo pripravo vzorcev ter hkratno določanje velikega števila substanc. Razvili smo presejalno metodo določanja ostankov karazolola, azaperona, azaperola, acepromazina, propionilpromazina in klorpromazina v različnih živilih živalskega izvora in urinu. Priprava vzorca pred kromatografsko določitvijo (HPLC) je bila enaka za vse matrice in vključuje uporabo ekstrakcijskih kolon Evolute CX. Za kromatografsko ločbo smo uporabljali monolitno analitsko kolono Chromolith®. Pri določitvi smo kombinirali dva tipa detektorjev, spektrofotometrični detektor z nizom diod (DAD) in fluorescentni detektor (FLD). Metodo je mogoče uporabiti tudi kot potrditveno za tiste od naštetih substanc, katerih uporaba ni prepovedana v veterinarski medicini.

Ključne besede: pomirjevala; živila; HPLC-DAD-FLD

Uvod

Pri rejnih živalih majhni odmerki pomirjeval zmanjšujejo agresivnost živali in ugodno vplivajo na težo. Posebno prašiči so občutljivi na stres, ki lahko vpliva tudi na kakovost njihovega mesa ali celo povzroči smrt. Pred prevozom prašičev v klavnico se zato praviloma uporabi karazolol ali azaperon (Arneth W., 1990; Cerkvenik-Flajs V., 2007). Slednji metabolizira v azaperol, tako da je potrebno poznati vsebnosti obeh analitov. Promazini so, zaradi genotoksičnih lastnosti, v veterinarski medicini prepovedani.

Analitska metoda mora zajemati vse pomembne aktivne substance in metabolite. Njena občutljivost mora biti ustrezna za določanje prepovedanih promazinov, hkrati pa mora biti delovno območje dovolj široko, da je z njo mogoče nadzorovati koncentracije dovoljenih pomirjeval. Idealne so metode, pri katerih je priprava popolnoma neodvisna od matrice, tako da lahko različne matrice merimo hkrati. Ponovljivost oziroma raztros izmerjenih vrednosti in pa obnovljivost, to je ponovljivost postopka v daljšem časovnem obdobju in za različne vzorce, pa je eden od najpomembnejših kriterijev ustreznosti analiznega postopka.

Materiali in metode

Poleg običajne laboratorijske opreme in topil smo uporabljali:

- ekstrakcijske kolone Biotage: Evolute CX-50, 6 ml, 200 mg,
- Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC,
- Agilent 1260 Infinity DAD detektor (s 4 µl celico in 60 mm optično potjo, ki je narejen posebej za določanje nizkih koncentracij),

- Agilent 1260 Infinity FLD detektor,
- analitska kolona Merck Chromolith® high resolution RP-18 endcapped (100 x 4.6 mm).

Rezultati

Za analizo smo potrebovali 5 g vzorca. Po ekstrakciji pomirjeval z acetonitrilom smo ekstraktu uravnali pH in ga prečistili z ekstrakcijo tekoče-trdno na kondicioniranih ekstrakcijskih kolonicah. Nečistoče smo izprali z metanolom, pomirjevala pa eluirali z alkalnim metanolom. Sledilo je koncentriranje eluata pod dušikom do suhega in rekonstitucija vzorca v mobilni fazi. Pri analizi s tekočinsko kromatografijo smo uporabljali gradientno elucijo, mobilna faza je bila mešanica acetonitrila (MeCN) in 0,01 M natrijevega acetata s pH 4,5. Pretok mobilne faze je bil 0,7 ml/min, volumen injiciranega vzorca pa 0,1 ml. Promazine smo detektirali v UV območju, klorpromazin pri 256 nm, acepromazin in propionilpromazin pa pri 240 ali 280 nm. Za zaznavanje karazalola, azaperona in azaperola smo uporabili fluorescenčni detektor, molekule smo vzbujali s svetlobo 245 nm, merili pa izsevno svetlobo pri 345 nm.

Razprava

Cilj razvoja je bil čim enostavnejša priprava vzorca pred merjenjem, pri kateri so ekstrakti dovolj čisti, da signale analitov pri izbranih koncentracijah ločimo od ozadja. Preskusili smo različne ekstrakcijske kolone tekoče-trdno: Agilentov Bond Elut EN QuEChERS, J.T. Baker Bakerbond NH₂, Waters Oasis HLB in Oasis MCX, Phenomenex Strata-X-C, najboljše rezultate pa smo dobili z uporabo Biotage Evolute CX-50.

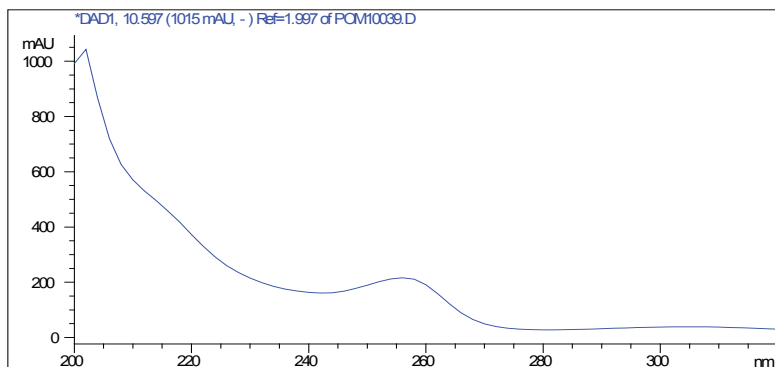
V procesu razvoja metode smo testirali celo vrsto analitskih kolon: Merck LiChrospher 60 RP-select B (250 x 4.0 mm; 5 µm), Phenomenex Synergi MAX-RP 80A (150 x 4.6 mm; 4 µm) ter monolitne Merck Chromolith® high resolution RP-18 endcapped (100 x 4.6 mm). Od kromatografske ločbe pričakujemo, da v čim krajšem času čim bolje loči prisotne analite med seboj – kromatografski vrhovi se ne smejo prekrivati. Zaradi najboljše ponovljivosti in najkrajših zadrževalnih časov in posledično najkrajšega časa analize, smo se odločili za slednjo.

Valovne dolže merjenja smo izbrali na osnovi absorpcijskih maksimumov analitov (Slika 1) in na osnovi čistosti ekstraktov posameznih matric.

Eden najpomembnejših elementov vsakega analiznega postopka je dokazovanje pravilnosti rezultatov. Skupaj s testiranimi vzorci smo vedno testirali slepi in obogateni vzorec. Količina dodanega analita k obogatenemu vzorcu je bila odvisna od tega, ali obstaja vrednost MRL ali ne. V prvem primeru smo dodali koncentracijo analita, ki je ustrezala 0,5-kratniku najmanjše vrednosti MRL, v drugem primeru pa je bil dodatek enak meji določljivosti naše metode (Tabela 1).

Kot je razvidno iz Tabele 1, je razvita metoda za večino matric bolj občutljiva, kot je nujno potrebno.

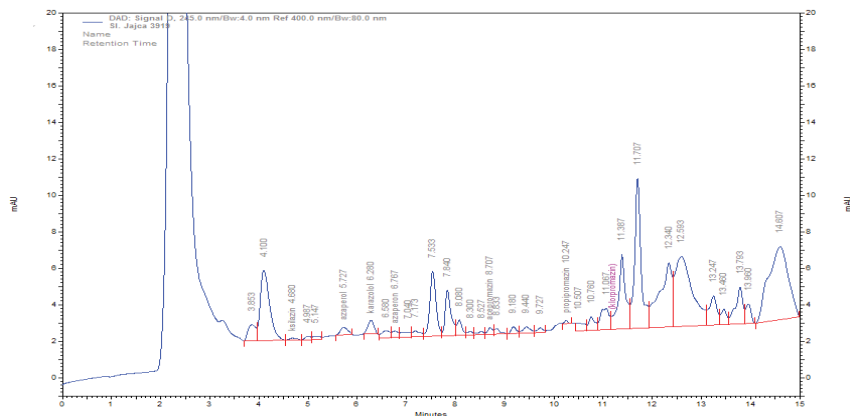
Kadar v vzorcih ni signalov na mestih, kjer so v obogatenem vzorcu signali dodanih analitov, je vzorec ocenjen kot negativen. V kolikor pa ima kateri od vzorcev večji signal na istem mestu, kot je signal katerega od dodanih analitov v obogatenem vzorcu, je tak vzorec

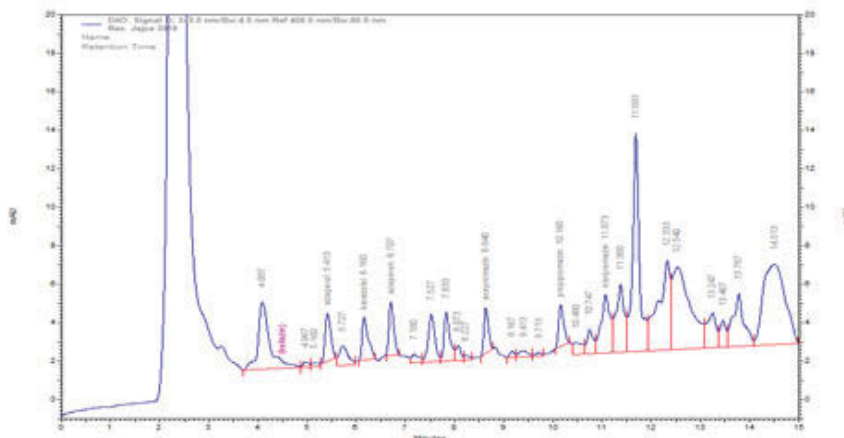


Slika 1: UV spekter klorpromazina

Tabela 1: Preglednica MRL in EURL priporočenih vrednosti za posamezne analite ter meja odločitve (CC β) razvitega analitskega postopka

analit	marker	vrsta živali	tkivo	MRL (37/2010) ali priporočene vrednosti* (CRL 2007) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	CC β [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
azaperon	vsota azaperola in azaperona	prašič	ledvice	100	2,5
karazolol	karazolol	prašič	ledvice	25	0,5
		govedo	ledvice mleko	15 1	0,5 0,5
klorpromazin	klorpromazin	prašič	ledvice	10*	2,5
		govedo	ledvice mleko	10* 10*	2,5 2,5
		perutnina	jajca	10*	2,5
acepromazin	acepromazin	prašič	ledvice	50*	25
		govedo	ledvice	50*	25
propionilpromazin	propionilpromazin	prašič	ledvice	50*	25
		govedo	ledvice	50*	25





Slika 2: Kromatogram slepega (A) in obogatnega (B) vzorca jajc

sumljiv (Slika 2). V takih primerih je potrebna ponovna analiza s potrditveno metodo. V primeru klorpromazina je za potrditev obvezna uporaba LC-MS/MS, medtem ko ostala pomirjevala lahko kvantitativno ovrednotimo kar z opisano metodo.

Reference

Arneth W. Multimethod for the residue-analysis of some tranquilizers and carazolol in animal tissue and urine. Residues of veterinary drugs in food. Proceedings of the EuroResidue conference, Noordwijkerhout: The Netherlands 1990: 101-104.

Cerkvenik-Flajs V. Determination of residues of azaperone in the kidneys by liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 2007; 586: 374-382.
Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 z dne 22. Decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora (UL L 15, 20.1.2010, str. 1)

Community Reference Laboratories (CRLs) for residues according to Council Directive 96/23/EC. CRL's view on state-of-the-art analytical methods for national residue control plans. CRL Guidance Paper 2007

Determination of sedative residue

Sedatives are used in veterinary medicine. In small doses sedatives at the farmed animals reduce the aggression and increase their weight. Pigs are especially sensitive to stress, which influences meat quality.

The technique development has brought changes in determination of veterinary medicine drugs residues. We replace the existing methods with new, which allows faster sample preparation and simultaneous determination of large number of analytes. We developed screening method for determination of carazolol, azaperone, azaperole, acepromazine, propionylpromazine and chlorpromazine in different food of animal origin and urine. We introduced a uniform clean-up procedure on solid phase extraction columns Evolute CX and used monolithic Chromolith® analytic column. The same chromatographic conditions for different matrixes are used and two detectors DAD and FLD connected in series were used.

Key words: sedative; food; HPLC-DAD-FLD