

ANNA KOZAK, HENRYKA WIŚNIEWSKA-DMYTROW

Oznaczanie pozostałości lasalocidu w tkankach zwierząt

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Determination of lasalocid residues in animal tissues

A method for the determination of lasalocid residues in animals tissues (muscles and livers) has been developed. Lasalocid was extracted from tissues with acetonitrile. The extract was washed with hexane, the hexane then was discarded and acetonitrile was evaporated under nitrogen. Residues were partitioned between water saturated during the liquid chromatography mobile phase and a mobile phase. Lasalocid was determined by liquid chromatography with a fluorescence detector (excitation at 310 nm, emission at 4440 nm) and a RP C 18 column. The method permits the detection of 0.02 µg of lasalocid in 1 g of tissue, recovery being about 85%.

Lasalocid (Avatec), o wzorze sumarycznym $C_{34}H_{53}O_8Na$, jest antybiotykiem politerowym wytwarzanym na drodze fermentacji z hodowli szczepu *Streptomyces lasaliensis*. W praktyce weterynaryjnej jest stosowany głównie do zwalczania kokcydiozy. Oddziałuje na wczesne stadia kokcydiów poprzez wybiórcze blokowanie transportu jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} oraz jonów jednowartościowych (2, 10). Lek jest dodawany do mieszanek paszowych przeznaczonych dla kurcząt i indyków rzeźnych w dawce 75 mg/kg oraz dla kurcząt hodowlanych do 16 tyg. życia w dawce 75-125 mg/kg (okres karencji 5 dni). Podawany w zalecanych dawkach wykazuje wysoką skuteczność, a jednocześnie jest nietoksyczny, jak również nie działa teratogenicznie. Podawany w nadmiarze może stać się przyczyną zatrucia i pozostawać w żywności zwierzęcego pochodzenia, a tym samym dostawać się do organizmu człowieka. Lasalocid stosowany jest również jako stymulator wzrostu w wielkostadnej hodowli bydła (4, 12).

Lasalocid jest związkiem nietłotnym i nie absorbuje promieniowania w zakresie światła UV, co ogranicza liczbę technik chemicznych pozwalających na jego oznaczenie. W latach siedemdziesiątych najczęściej stosowanymi metodami oznaczania leku były: bioautografia (11, 15), chromatografia cienkowarstwowa (7, 15), metody spektrofotometryczne (1) oraz chromatografia gazowa (9, 14, 16). W piśmiennictwie z ostatnich lat ukazało się szereg prac analitycznych, w których opisano oznaczanie lasalocidu metodą wysoko sprężonej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV (3) i detekcją fluorescencyjną (5, 6, 8, 9, 13).

We wcześniej opublikowanej pracy przedstawiono metodę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oznaczania kokcydiostatyków jonoforowych, w tym również lasalocidu, w mieszanek paszowych (7). W praktyce stwierdzano nawet kilkakrotnie wyższe od zalecanych stężenia lasalocidu w paszach. Ponieważ przedawkowanie może być przyczyną zatrucia zwierząt, a ponadto istnieje możliwość przechodzenia antybiotyku do tkanek (17), konieczne jest stałe kontrolowa-

nie poziomu tego leku w żywności zwierzęcego pochodzenia (2, 4, 10).

W pracy opisano opracowaną na podstawie piśmiennictwa i badań własnych metodę chromatografii cieczowej oznaczania lasalocidu w tkankach zwierząt (mięśnie, wątroby).

Zasada metody

Lasalocid ekstrahuje się z tkanek zwierząt (mięśnie, wątroby) acetonitrylem. Ekstrakt odfuszcza się heksanem. Warstwę acetonitrylową, po odparowaniu w strumieniu azotu, rozpuszcza się w wodzie nasyconej fazą ruchomą do HPLC. Po wymieszanu i odwirowaniu, górną fazę organiczną analizuje się jakościowo i ilościowo w chromatografii cieczowej z detektorem fluorescencyjnym i kolumną z odwróconą fazą C_{18} .

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

1. Butla ze sprężonym azotem.
2. Chromatograf cieczowy f-my LDC, model 1202, pompa Constametric IIG, detektor fluorescencyjny FS 970 f-my Schoeffel, kolumna Partisil PXS 10/25 (250 × 4,6 mm), dozownik Rheodyne 7125, pętla 20 µl lub podobne.
3. Homogenizator laboratoryjny (Polytron, itp.).
4. Łaźnia wodna.
5. Mieszadło laboratoryjne typu Vortex.
6. Odparowywacz obrotowy.
7. Wirówka laboratoryjna oraz typowy sprzęt laboratoryjny.

Odczynniki

1. Acetonitryl, cz.d.a.
2. Alkohol metylowy, cz.d.a.
3. Amoniak, 25% roztwór cz.d.a.
4. Tetrahydrofuran, cz.
5. Heksan, cz.d.a.
6. Lasalocid (sól sodowa), wzorzec z Hoffman-La Roche, Products Ltd.

a) Roztwór podstawowy, 1000 µg/ml: odważyć w łódeczce z folii aluminiowej kilkanaście miligramów soli sodowej lasalocidu, przenieść do kolbki ze szlifem i rozpuścić w równoważnej ilości ml tetrahydrofuranu.

b) Roztwory robocze:

- roztwór roboczy A, 100 µg/ml: rozcieńczyć 5 ml roztworu podstawowego do 50 ml tetrahydrofuranem
- roztwór roboczy B, 50 µg/ml: rozcieńczyć 25 ml roztworu roboczego A do 50 ml tetrahydrofuranem
- roztwór roboczy C, 25 µg/ml: rozcieńczyć 25 ml roztworu roboczego B do 50 ml tetrahydrofuranem.

Roztwory wszystkich wzorców przechowywać w szczelnie zamkniętych kolbkach w temp. 0°C lub niższej. Roztwór podstawowy zachowuje trwałość 5 miesięcy, roztwory robocze dwa tygodnie.

Wszystkie używane w analizie rozpuszczalniki powinny być redestylowane.

Postępowanie

1. Przygotowanie fazy ruchomej do HPLC

W rozdzielaczu sporządzić mieszaninę rozpuszczalników: heksan + tetrahydrofuran + alkohol metylowy + amoniak (840+120+30+10, V/V). Wymieszać dokładnie i pozostawić, aż górna warstwa będzie klarowna (około 1 godz.). Dolną warstwę odrzucić. Fazę ruchomą przechowywać w szczelnie zamkniętym naczyniu. Faza ruchoma jest trwała 1 tydzień.

2. Przygotowanie wody nasyconej fazą ruchomą do HPLC

Do rozdzielacza wlać 50 ml wody (dejonizowanej, destylowanej) i 100 ml fazy ruchomej do HPLC. Wytrząsać energicznie przez 30 – 40 sek. Mieszaninę pozostawić do rozdzielania. Dolną warstwę pobierać bezpośrednio przed użyciem. Mieszaninę sporządzać świeżą każdego dnia.

3. Przygotowanie próbek do analizy

Próbki do oznaczenia pozostałości lasalocidu powinny być przechowywane w stanie zamrożonym. Przed rozpoczęciem analiz należy każdą próbkę rozmrozić, rozdrobnić i dokładnie wymieszać.

Do przygotowania kontrolnych próbek z dodatkiem wzorców (wzmocnionych) należy używać mięśni lub wątrób uprzednio oznaczonych, wolnych od lasalocidu. W celu wzmocnienia do próbek (100 g) dodaje się po 0,1 ml roztworów roboczych lasalocidu A, B i C; końcowe stężenia wynoszą odpowiednio 1,0, 0,5 i 0,25 µg/g.

4. Ekstrakcja i oczyszczanie

Do próbki wirówkowej o poj. 100 ml odważyć 10 g rozmrożonej, częściowo rozdrobnionej tkanki (mięśnie, wątroby). Dodać 30 ml acetonitrylu i homogenizować 15 – 30 sek. Następnie wirować przez 10 min. z szybkością 2000 – 2500 obr./min. Warstwę acetonitrylową przenieść do kolby Erlenmayera, a tkankę homogenizować ponownie z 30 ml acetonitrylu. Po odwirowaniu połączyć warstwę acetonitrylową. Do dalszej analizy do rozdzielacza pobrać 30 ml ekstraktu (odpowiada to 5 g tkanki). Dodać 30 ml heksanu i wytrząsać energicznie przez 15 – 20 sek. Oczyszczanie heksanem powtórzyć. Warstwę acetonitrylową przenieść do kolbki odparowywacza obrotowego i zagaęścić do objętości 0,5 ml w temp. 45 – 60°C. Pozostałość przenieść ilościowo (trzema porcjami po 2 ml acetonitrylu) do 15 ml próbki wirówkowej i zagaęścić do 0,5 ml w strumieniu azotu, dodać 1 ml wody nasyconej fazą ruchomą do HPLC. Mieszać na Vortexie przez 15 – 20 sek. Następnie dodać 2 ml fazy ruchomej do HPLC i ponownie mieszać 15 – 20 sek. Wirować przez 10 min. z szybkością 1500 – 2000 obr./min. Klarowną górną warstwę analizować w chromatografii cieczowej.

5. Analiza chromatograficzna

Kolumna – Partisil PXS 10/25 (250 × 4,6 mm) Whatman
Faza ruchoma: heksan + tetrahydrofuran + alkohol metylowy + amoniak (840 + 120 + 30 + 10, V/V).

Przepływ – 1,5 ml/min.

Czułość detektora – 0,01.

Długość fali wzbudzenia – 310 nm, długość fali emisji 440 nm.

Dozowana objętość – 20 µl.

Prędkość przesuwu papieru – 0,5 cm/min.

Przy powyższych parametrach oznaczania czas retencji lasalocidu wynosi 6 min.

Obliczenia

Identyfikację lasalocidu przeprowadzić przez porównanie czasów retencji pików występującego w badanych ekstraktach z pikami roztworów wzorcowych. Dla próbek wzmocnionych A, B i C, w których stężenie lasalocidu wynosi $y_A = 1,0$, $y_B = 0,5$ i $y_C = 0,25$ µg/g należy zmierzyć wysokości pików

lasalocidu x_A , x_B i x_C . Następnie obliczyć współczynniki równania regresji m i b wg wzoru:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

gdzie:

m – nachylenie krzywej,

b – punkt przecięcia krzywej z osią Y,

n – liczba próbek wzmocnionych ($n = 3$).

Zawartość lasalocidu w badanej próbce y (w µg/g) obliczyć podstawiając do równania regresji liniowej $y = mx + b$ zmierzoną wysokość pików x oraz obliczone wcześniej współczynniki m i b .

Poprawność oznaczeń sprawdzić obliczając błąd oznaczania wg następującego wzoru:

$$\sqrt{\frac{\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} - m^2 \left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]}{(n-2) \left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]}}$$

Błąd powinien mieć wartość $\leq 0,02$.

Wyniki i omówienie

Wartość stosowanej procedury analitycznej sprawdzono w warunkach wewnątrzlaboratoryjnych przeprowadzając oznaczenia w 10 próbkach mięśni i 10 próbkach wątrób, które wzmocniono znanym stężeniem lasalocidu – 0,100 µg/g. Rozrzut uzyskanych wyników wahał się od 0,076 do 0,096 µg/g dla mięśni i od 0,094 do 0,102 µg/g dla wątrób. Odchylenie standardowe wynosiło odpowiednio 0,005 µg/g i 0,004 µg/g, zaś odzysk 85,8% i 98,6%. Wartość współczynnika zmienności mieściła się w granicach uznawanych dla oznaczeń metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej ($< 10\%$) i wynosiła: dla mięśni – 4,6% i dla wątrób – 3,5%.

Otrzymane wyniki pozwalają określić opracowaną metodę jako wystarczająco precyzyjną, dokładną i czułą. Metoda pozwala wykryć 0,02 µg lasalocidu w 1 g tkanki.

Piśmiennictwo

- Brooks M. A., D'Arconte L., de Silva J. A. F., Chen G., Crowley C.: J. Pharmaceut. Sci. 64, 1874, 1975.
- Dowling L.: Avian Pathology 21, 355, 1992.
- Gallicano K. D., Park H., Yee J., Young L. M.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 71, 48, 1988.
- Hencken H.: Wiad. Parazyt. 33, 315, 1987.
- Horii S., Miyahara K., Momma C.: J. Liq. Chromatogr. 13, 1411, 1990.
- Kaykary M., Weiss G.: J. Agric. Food Chem. 31, 81, 1983.
- Kozak A.: Medycyna Wet. 47, 184, 1991.
- Martinez E. E., Shimoda W.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 69, 637, 1986.
- Newkirk D. R., Barnes C. J.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 72, 581, 1989.
- Pressman B. C., Fahim M.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22, 465, 1982.
- Stipkovits L., Juhasz S.: Acta Vet. Hung. 35, 237, 1987.
- Weber G. M., Frigg M., Zintzen H.: Wiad. Parazyt. 33, 348, 1987.
- Wells G., Felicitio N. R., Kaykary M., Chen G., Caruso A., Hargroves E., Crowley C., MacDonald A.: J. Agric. Food Chem. 31, 75, 1983.
- Weiss G., Kaykary M., Miwa B.: J. Agric. Food Chem. 31, 78, 1983.
- Weiss G., MacDonald A.: J. Ass. Off. Anal. Chem. 68, 971, 1985.
- Westley J. W., Evans R. H., Stempel A.: Anal. Biochem. 59, 574, 1974.
- Zmudzki J., Kozak A., Wiśniewska-Dmytrow H.: Życie Wet., w druku.

Adres autora: mgr inż. Anna Kozak, ul. Wojska Polskiego 9/17, 24-100 Puławy