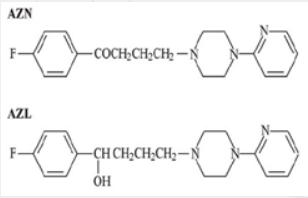
15-та НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ “ОБЕДИНЕНИ ОТ НАУКАТА”
15th SCIENTIFIC CONFERENCE “UNITED BY SCIENCE”

ВАЛИДИРАНЕ НА МЕТОД ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО И КАЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АЗАПЕРОН И АЗАПЕРОЛ В СВИНСКИ БЪБРЕК С ПОМОЩТА НА LC-MS-MS

Тодорка Янковска-Стефанова и Милена Фунева-Пейчева
Централна Лаборатория по Ветеринарно Санитарна Експертиза и Екология ЦЛВСЕЕ, София, България

METHOD VALIDATION FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF AZAPERONE AND AZAPEROL IN PORK KIDNEY BY LC-MS-MS

Todorka Yankovska-Stefanova, Milena Funeva-Peycheva
Central Laboratory of Veterinary Control and Ecology – CLVCE, Sofia, Bulgaria



Азаперонът е седативен препарат, действащ на централната нервна система, който се използва във ветеринарната медицина при прасета за намаляване на страха и агресията. Той се метаболизира в бъбреците до съединението азаперол. Съгласно Регламент (ЕС) 37/2010 на Комисията, максимално допустимата стойност на сумата от остатъчните количества азаперон и азаперол в свински бъбрек е 100 µg/kg. Съгласно Ръководство на референтната лаборатория на ЕС за минимални изисквания за ефективност на методите от 2020 година тя е намалена от 100 на 5 µg/kg.

В Централна Лаборатория по ветеринарно санитарна експертиза и екология през последните 2 десетилетия се контролират остатъчни количества от азаперон и азаперол в свински бъбрек с помощта на Високо-ефективна течна хроматография снабдена с диодарей детектор (HPLC-DAD), както и с масспектрометричен детектор (LC-MS-MS). Във връзка с значителното понижаване на минималните изисквания за ефективност на методите, за двата аналита е разработен и ревалидиран метод определящ тяхното качество и количество. Този метод включва пробоподготовка на матрицата от свински бъбрек състояща се от: екстракция с ацетонитрил, твърдофазна екстракция с картридж Strata XL-C, концентрация на пробата под азот и последвана от инструментален анализ с помощта на LC-MS-MS. Използвана е хроматографска колона Kinetex C18 на фирмата Phenomenex, с размер 50 x 2.1 mm и пълнеж 2.6 micron. Оптимизирани са параметрите на хроматографското разделяне чрез разработване на градиентна програма за мобилните фази: (A) - амониев ацетат с pH 4.0 и (B) - ацетонитрил. В изследваният обект съдържанието на азаперон и азаперол се представя в µg/kg.

Подготовка на пробите

2,5 грама проба
+ 15 µl от р-р на Халоперидол (вътрешен стандарт) с конц. 10µg/ml.
Екстракция с 15ml ацетонитрил, хомогенизиране на вортекс и центрофугиране при 8500 rpm, 10 min

Органичният слой се отдекантира във втора (чиста) центрофужна епруветка, корекция на pH с оцетна киселина до 3,8.

***Твърдо-фазно пречистване на екстракта (SPE)* Strata XL-C**

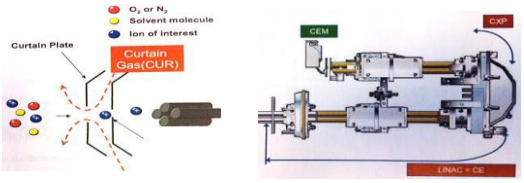
активиране: - 3 мл CH_3OH
- 3 мл H_2O
нанасяне на проба
промиване: - 3 мл р-р 0,1 N HCl
- 3 мл CH_3OH
елуиране: - 6 мл р-р 5:95 (v:v) 25%NH_4OH:CH_3OH
Елуатът се изпарява до сухо под N_2
Възстановяване с 0.5 мл 10% разтвор на метанол във вода.

Калибрационна графика на проби свински бъбрек с внесена добавка на Азаперон и Вътрешен стандарт Халоперидол

Инструментален анализ

LC-MS/MS УСЛОВИЯ

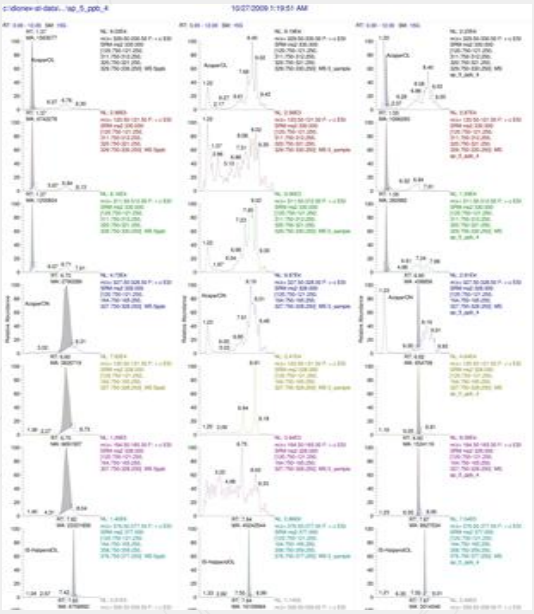
Подвижна фаза А) 0,02M (CH_3COONH_4) с pH = 4,0;
Подвижна фаза Б) ацетонитрил.



Първоначалните условия на състава са 95:5 (v:v), а ацетонитрилът се увеличава на 80% от 5 мин. до 12 мин. От 12.5 до 15 мин. системата се уравновесява с първоначалните условия на състава на подвижната фаза. Скоростта на потока на подвижната фаза е 0.250 ml/min.
Хроматографска колона - Kinetex C18 на фирмата Phenomenex, с размер 50 x 2.1 mm

Резултати и заключение

Разработен е метод за качествен и количествен анализ на Азаперон и Азаперол, с предварителна пробоподготовка на пробите. Методът е валидиран съгласно Регламент за изпълнение (ЕС) 2021/808 на Комисията, покривайки критериите: истинност, повторяемост (2.5µg/kg – 0.28µg/kg) и вътрешнолабораторна възпроизводимост (2.5 µg/kg - 22 %), селективност, абсолютен аналитичен добив (2.5 µg/kg - 94 %), работен обхват (2.5 µg/kg - 10 µg/kg), граница за решение за потвърждение CCα (Азаперон CCα 3.15 µg/kg; Азаперол CCα 3.93 µg/kg) и неопределеност. Създаденият метод отговаря на изискванията на законодателството на Европейския съюз. Всички изследвания бяха извършени при стандартизирани лабораторни условия и спазване принципите на добрата лабораторна практика (GLP). Методът е потвърден чрез участие в междулабораторно изпитване включващо 35 европейски лаборатории, организирано от референтната лаборатория на Европейския съюз в Нидерландия, като според организаторите участието ни е преминало успешно.



Хроматограми на стандартен разтвор, “чиста” проба свински бъбрек и проба с внесена добавка на Азаперон и Азаперол при концентрационно ниво 5µg/kg, както и Вътрешен стандарт Халоперидол.