CH 6.3.

STANOVENIE TETRACYKLÍNOV METÓDOU HPLC

1. URČENIE METÓDY

Skúšobná metóda je použiteľná pre stanovenie tetracyklínov v biologických materiáloch živočíšneho charakteru, ako sú: bravčový sval a vnútornosti, hovädzí sval a vnútornosti, hydinový sval a vnútornosti, ryby, mlieko čerstvé a sušené, vajcia čerstvé a sušené, med.
Touto metódou je možné stanovenie nasledujúcich tetracyklínov:
• Tetracyklín (TTC)
• Oxytetracyklín (OTC)
• Chlortetracyklín (ChTC)
• Doxycyklín (DOX)

2. PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovaná vzorka sa opakovane extrahuje Mc-Ilvainovým pufrom, odstredí a filtruje. Eluát sa po prečistení technikou SPE odparí do sucha a zvyšok sa zakoncentruje do rozpúšťadla, ktoré odpovedá zloženiu mobilnej fázy na počiatku gradientu. Pre kvantifikáciu sa používa technika HPLC s DAD detekciou pri vlnovej dĺžke 362 nm.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

• Kuchynský mlynček na mäso
• Rýchlobežné laboratórne miešadlo Ultra Turrax
• Rotačná vákuová odparka
• Centrifúga
• Laboratórna trepačka
• Ultrazvuková vaňa
• Vákuová jednotka SPE (solid phase extraction)
• Systém na prečisťovanie destilovanej vody Milli-Q-Gradient, Millipore
• HPLC 1100 s DAD detektorom, Agilent
• Analytická kolóna LiChroCart 250-4 LiChrospher100 RP-8e, 5µm,s predkolónou, Merck
• Kalibrované odmerné sklo
• Striekačkové membránové filtre Nylon 0,45 µm

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité chemikálie a materiály musia byť vhodné pre HPLC analýzu:
• Acetonitril, gradient grade

• Metanol, gradient grade
• Kyselina oxalová kryštalická, Suprapur
• Kyselina citrónová monohydrát, Extrapure
• Kyselina jantárová
• Kyselina etyléndiaminotetraoctová EDTA, disodná soľ dihydrát
• Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a.
• HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Plus
• SPE kolónky-OASIS HLB, 200 mg, 6ml

4. PRACOVNÝ POSTUP

4.1. PRÍPRAVA VZORKY

Laboratórna vzorka sa zmixuje tak, aby sa získal homogénny materiál. Odoberie sa najmenej 100 g a uchováva sa v mrazničke pri cca -18°C až po analýzu.

Mäso, sval:
Do kadičky sa odváži 5 g priemernej vzorky, zaleje sa Mc-Ilvainovho pufrom a vzorka sa zhomogenizuje rýchlobežným laboratórnym miešadlom Ultra-Turax. Obsah sa kvantitatívne preleje do centrifugačnej skúmavky. Odstreďuje sa 10 min pri 3000 ot/min. Supernatant sa prefiltruje na Büchnerovom lieviku. Tento postup sa zopakuje s Mc-Ilvainovho pufrom, čím sa získa extrakt, ktorý sa prečistí SPE technikou na 200 mg HLB kolónkach.

Med:
Do Erlenmayerovej banky sa odváži 5 g medu, pridá sa voda pre HPLC a rozmieša sa. Pridá sa *Mc-Ilvainovho pufor* a celý obsah Erlenmayerovej banky sa trepe na laboratórnej trepačke asi 15 min. Celý obsah sa následne prečistí SPE technikou na 200 mg HLB kolónkach.

Mlieko:
Do centrifugačnej skúmavky sa odváži 5 g priemernej vzorky mlieka, pridá sa Mc-Ilvainovho pufor a následne sa centifuguje 10 min pri 3000 ot/min. Extrakt sa prefiltruje cez filtračný papier. Tento postup sa zopakuje ešte s Mc-Ilvainovho pufrom, čím sa získa extrakt, ktorý sa prečistí SPE technikou na 60 mg HLB kolónkach.

Vajce:
10 g rozmixovaného vajca sa naváži do Erlenmayerovej banky a extrahuje sa 5 min s *sukcinátovým pufrom* v ultrazvuku. Následne sa vytrepáva na trepačke 15 min. Potom sa celý obsah preleje do centrifugačnej skúmavky a scentrifuguje sa 15 min pri 4000 ot.min. Zmes sa prefiltruje cez vatu a k filtrátu sa pridá NaCl, dobre sa pretrepe a opäť prefiltruje. Ďalej sa filtrát upravuje SPE na 200 mg HLB kolónkach.

4.2. PRÍPRAVA MERANIA

HPLC podmienky:

Mobilná fáza: A – 0,01 M roztok kyseliny oxalovej v HPLC – grade H_2O
B – Acetonitril
C – Metanol
Zloženie mobilnej fázy: izokraticky 63% A + 20% B + 17% C
Prietok: 1 ml/min
Nástrek : 50 µl
Detekcia: DAD 362 nm
Teplota kolóny: 30°C

4.3. MERANIE

Extrakty vzoriek analyzujeme kvapalinovým chromatografom, ktorý je špecifikovaný v kap. 3.1. Pred každú sériu vzoriek zaradíme štandard tetracyklínov so známou koncentráciou, ktorým verifikujeme správnosť naladenia prístroja a retenčné časy jednotlivých píkov.

5. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

HPLC 1100 (HP, Agilent)
Pre výpočet koncentrácie tetracyklínov používame multikalibračný program Data analysis, ktorý je súčasťou programového vybavenia pre ovládanie chromatografického systému a spracovanie chromatografických údajov LC Chemstation software.

Hodnota výsledku je vyjadrená v µg/g (mg/kg) vzorky podľa nasledujúceho vzorca:

$$m = \frac{c.V.r}{n}$$

m = hmotnosť v µg/g
c = nameraná koncetrácia analytu v µg/ml
V = objem v ml
n = návažka vzorky v g
r = zrieďovací faktor

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

[1] Sokol J., Breyl I. a kol.: Veterinárne laboratórne metodiky (špeciálna časť), Metódy stanovenia cudzorodých látok v surovinách živočíšneho pôvodu, potravinách, krmivách a vo vode, Štátna veterinárna správa SR Bratislava, 2000, 225-229

[2] Waters Oasis Sample extraction products, Environmental & Agrochemical Applications Notebook, Waters Corporation, Massachussetts, USA, 2002, 13-15

CH 6.3.
Stanovenie chlórtetracyklínu v premixoch a kŕmnych zmesiach metódou HPLC

1. Určenie metódy

Metóda je vhodná na stanovenie chlortetracyklínu, ako aj oxytetracyklínu, tetracyklínu a doxycyklínu vo vzorkách krmív.

2. Princíp metódy

Vzorky sa po homogenizácii a extrakcii analyzujú HPLC metódou na RP-C18 kolónach a detegujú sa DAD detektorom pri 360 nm. Nasnímané spektrá v intervale 300 – 420 nm sa porovnávajú s kalibračnými spektrami.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- ultrazvukový kúpeľ
- analytické váhy
- trepačka
- kvapalinový chromatograf s DAD detektorom
- kolóna Hypersil BDS-C18, 4,0 x 250 mm, 5 µm, alebo ekvivalentný typ kolóny
- automatické pipety s nastaviteľným objemom, jednokanálové
- filtračný papier
- striekačkové filtre
- mraznička
- chladnička

3.2. Chemikálie a roztoky

- metanol pre HPLC
- metanol p.a.
- acetonitril pre HPLC
- redestilovaná voda pre HPLC
- Kyselina oxálová, dihydrát, p.a.
- kyselina chlorovodíková, 35 %, p.a.
- acetón p.a.

- štandardy: chlortetracyklin hydrochlorid

oxytetracyklin hydrochlorid
tetracyklin hydrochlorid
doxycyklin hydrochlorid

4. Pracovný postup

- krmivo s výnimkou premixov tesne pred navažovaním dobre premiešať, pomleť a znovu dobre premiešať, premixy dobre premiešať
- s presnosťou na 1 mg navážiť 2,5 g kŕmnej zmesi, resp. 50 mg premixu do 100ml,odmernej banky (v závislosti od reálnej vzorky môže byť navážka väčšia)
- pridať 25 ml extrakčnej zmesi, sonikovať v ultrazvukovom kúpeli 15 minút
- doplniť po značku 0.01 M kyselinou oxálovou, premiešať
- prefiltrovať cez papierový filter, prvé podiely vyliať
- prefiltrovanú vzorku prečistiť cez striekačkový membránový filter
- aplikovať vzorku na HPLC meranie

5. Podmienky merania

Kolóna:	Hypersil BDS-C18, 4,0 x 250 mm	
Mobilná fáza :	A	0,01M kyselina oxálová
	B	acetonitril
	C	metanol
Prietok mobilnej fázy :	1,0 ml/min	
Detekcia:	DAD pri 360 nm (360/16, 500/100), snímanie spektier: 300 – 420 nm	
Teplota kolóny:	25°C	
Objem nástreku :	20 µl, resp. 10 µl (vzorky premixov)	

6. Literatúra

Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, CH 6.3., 2004