CH 6.8. Stanovenie tetracyklínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC

1. Pôvod metódy

1. 2052/VI/84 súbor 6.11 II-4, Scientific Veterinary Committee, Working Group - "Reference Methods for Residues", General Criteria for the estabilishment of Reference Methods for the Detection of Residues.
2. ISO Standard 78/2-1982 Layout for standards - Part 2: Standard for Chemical Analysis.
3. MAFF, 1989, Determination of tetracyclines at residue levels in animal tissues. Food Science Laboratory, Colney Lane, Norwich, UK Standard Operating Procedure.
4. Farrington, W. H. H., Tarbin, J., Bygrave, J., Shearer, G. (1991). Food Addit. & Contamin. 8, 88 - 64.

2. Princíp metódy

Táto metóda sa skladá z nasledujúcich krokov:

- homogenizácia tuhých vzoriek v pufri alebo nariedenie mlieka pufrom,
- extrakcia sukcinátovým pufrom,
- extrakcia na SPE extrakčnej kolónke Oktyl,
- stanovenie pomocou HPLC s UV detekciou
- výpočet množstva tetracyklínov z kalibračnej krivky so zohľadnením výťažnosti tetracyklínu v konkrétnej matrici.

3. Použité prístroje a spotrebný materiál

Centrifugačné skúmavky
sklenené kolóny s
lievik 250 ml
kónické banky 250 ml,
banky s hruškovitým dnom 50 ml,
banky s guľatým dnom 250 ml,
filtračný papier
homogenizátor,
miešačka
rotačná odparovačka
pumpa HPLC
chromatografická kolóna plnená Lichrosorb C-8
UV detektor
integrátor Spectra Physics 4290,
dávkovač Waters Wisp 712,
SPE extrakčné kolónky

4. Zoznam chemikálií

Succinic anhydride,
hydroxid sodný,
EDTA,
metanol,
etanol,
acetonitril,
kyselina oxalová,
kyselina trichlóroctavá,
štandardy tetracyklínov

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov

Príprava štandardov
-Zásobný štandardný roztok sa pripravil rozpustením tetracyklínov v metanole na koncentráciu 1 mg/ml.

6. Príprava vzoriek

Množstvo vzorky musí byť dostatočné na vykonanie analýzy a taktiež na jej opakovanie v prípade potreby.
Vzorka musí byť odobratá a zabalená takým spôsobom, aby bola možná presná identifikácia v laboratóriu.
Postup: Sval:

1. nakrájaný sval sa spolu s pufrom umiestni do ultrazvukového kúpeľa na 3 min, následne sa homogenizuje 2 min a centrifuguje 5 min.
2. Supernatant sa prefiltruje cez filtračný papier.

SPE extrakčné kolónky Oktyl sa aktivujú. Na kolónku sa pripevní konektor so nástavcom. Do nástavca sa vlejú prefiltrované zmiešané extrakty a nechajú sa za zapnutého vákua vsakovať. Kolónka sa premyje 10 ml redestilovanej vody. Tetracyklíny sa z SPE kolónky eluujú.

7. Podmienky stanovenia

Kolóna:	Superspher C-18,
Mobilná fáza :	(acetonitril) : (metanol : acetonitril : 0,01 M vodný roztok kyseliny šťaveľovej v pomere 20:35:45 v:v:v) v pomere 20 : 80 v:v
Prietok mobilnej fázy:	0,5 ml / min
Detekcia:	UV 360 nm
Injektovaný objem:	20 µl
Teplota:	40 °C

Vzorky, obsahujúce tetracyklíny v koncentráciách mimo kalibračnej krivky, treba nariediť a pri výpočte zohľadniť príslušný objemový korekčný faktor.
Pri analýze sa odporúča po sérii 5-7 vzoriek kontrolná slepá vzorka so známym prídavkom tetracyklínu. Slepá vzorka sa získa z predchádzajúcej analýzy, je to vzorka, v ktorej neboli nájdené tetracyklíny.