CH 6.2. Stanovenie sulfónamidov metódou HPLC

1. Pôvod metódy
Ing. Alena Honzlová, ŠVÚ Jihlava.

2. Princíp metódy
Spočíva vo vyextrahovaní sulfonamidov zo svaloviny a ich následnom rozdelení metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie.

3. Použité prístroje
Robot na mletie vzoriek mäsa,
trepačka,
rotačný vákuový odparovák,
centrifúga
vysokoúčinný kvapalinový chromatograf s diode array detektorom prípadne s UV detektorom s premennou vlnovou dĺžkou.

4. Zoznam chemikálií
Octan etylnatý p.a.,
n- hexán p.a.,
metanol p.a. - prečistený destiláciou
acetonitril p.a. - prečistený vákuovou destiláciou,
octan sodný kryštalický p.a.,
kyselina octová p.a.,
redestilovaná voda.

5. Príprava štandardov a pracovných roztokov
Štandardné roztoky
Štandardné roztoky sulfonamidov sa pripravia rozpustením príslušného množstva v metanole.

6. Príprava vzoriek:
Svalovina, med:
Do Erlenmayerovej banky sa odváži mäso a zaleje sa octanom etylnatým. Uzavretá banka sa umiestni na trepačku a jej obsah sa nechá vytrepávať. Potom sa rozpúšťadlo zleje cez filtračný papier do banky. Tento roztok sa pipetou prenesie kvantitatívne do centrifugačnej skúmavky. Banka sa prepláchne dvakrát 2 ml n-hexánu , ktorý sa opäť prenesie do skúmavky. Obsah skúmavky sa dôkladne premieša, aby sa tuk previedol do hexánovej fázy.

Syry:
Zhomogenizuje sa 20 g vzorky a postupuje sa ako pri svalovine.

Surové vajcia:
Vzorka sa zaleje acetonitrilom a vytrepáva sa na trepčke 10 min. Homogenát sa sfiltruje cez Buchnerov lievik. Zbytok na filtračnom papieri sa premyje acetonitrilom a opäť sa sfiltruje. Oddelená vodná fáza sa extrahuje s 25 ml octanu etylnatého. Spodná vodná fáza sa odpustí a etylacetátová vrstva sa spojí s acetonitrilovým podielom po predchádzajúcom vysušení cez bezvodý síran sodný. *Mlieko:*
10 ml mlieka sa vytrepáva s 50 ml chloroformu v deliacom lieviku. Po usadení vrstiev sa obsah ešte raz pretrepe.

7. Podmienky stanovenia
Kolóna: LiChro CART C
Mobilná fáza: A: acetátový pufer
B: acetonitril
Detekcia:scan 230 – 400 nm,
Injekovaný objem: 25 ul

8. Kalibrácia a vyhodnotenie
Vyhodnotenie chromatogramov sa vykoná na základe metódy absolútnej kalibrácie porovnaním plôch píkov s plochami štandardných roztokov.

Príprava vzoriek:
Svalovina, med:
Do 250 ml Erlenmayerovej banky so zábrusom sa odváži 50 g rozomletého mäsa a zaleje sa 50 ml octanu etylnatého. Uzavretá banka sa umiestni na trepačku a jej obsah sa nechá vytrepávať 15 minút. Potom sa rozpúšťadlo zleje cez filtračný papier s 20 g síranu sodného bezvodého do 250 ml zábrusovej banky. Extrakcia sa opakuje ešte raz s 50 ml octanu etylnatého počas 10 minút. Spojené extrakty sa odparia na rotačnej vákuovej odparke pri 40°C. Zvyšok sa po odparení rozpustí v 1 ml metanolu, krúživým pohybom sa opláchnu steny a pridá sa 1 ml mobilnej fázy (na odstránenie koextrahovaných bielkovín). Tento roztok sa pipetou prenesie kvantitatívne do centrifugačnej skúmavky. Banka sa prepláchne dvakrát 2 ml n-hexánu , ktorý sa opäť prenesie do skúmavky. Obsah skúmavky sa dôkladne premieša, aby sa tuk previedol do hexánovej fázy.
Potom sa obsah skúmavky odstreďuje 10 min pri 3500 ot / min v centrifúge, čím sa vyčíri spodná vrstva, ktorá sa ďalej používa na analýzu. Ak by roztok zostal zakalený, skúmavky sa asi na dve minúty umiestnia do ultrazvukového kúpeľa a potom sa opäť ich obsah centrifuguje pri rovnakých podmienkach. Spodná vrstva sa odtiahne striekačkou a sfiltruje cez špičku s odmastenou vatou. Tento roztok sa použije k analýze.

Syry:
Zhomogenizuje sa 20 g vzorky a postupuje sa ako pri svalovine.

Surové vajcia:
Zhomogenizuje sa 50 g surových vajec, zaleje sa 100 ml acetonitrilu a vytrepáva sa na trepčke 10 min. Homogenát sa sfiltruje cez Buchnerov lievik. Zbytok na filtračnom papieri sa premyje 25 ml acetonitrilu a opäť sa sfiltruje. Spojené filtráty sa prelejú do deliaceho lievika, pridá sa k nim 7 g chloridu sodného, dôkladne sa pretrepe a nechá sa oddeliť vodná a acetonitrilová vrstva. Spodná vodná vrstva sa oddelí a acetonitrilová vrstva sa vysuší sfiltrovaním cez bezvodý síran sodný. Oddelená vodná fáza sa extrahuje s 25 ml octanu etylnatého. Spodná vodná fáza sa odpustí a etylacetátová vrstva sa spojí s acetonitrilovým podielom po predchádzajúcom vysušení cez bezvodý síran sodný. Spojené extrakty sa odparia na rotačnej vákuovej odparke a ďalej sa pokračuje ako pri svalovine.

Mlieko:

10 ml mlieka sa vytrepáva s 50 ml chloroformu v deliacom lieviku. Po usadení vrstiev sa obsah ešte raz pretrepe. Po úplnom oddelení vrstiev sa chloroformová vrstva vypustí do varnej banky cez bezvodý síran sodný. Chloroform sa odparí dosucha na rotačnej vákuovej odparke . Odparok sa rozpustí v 1 ml metanolu a ďalej sa pokračuje ako pri svalovine.

Moč:
5 ml moča sa extrahuje 10 ml octanu etylnatého pod dobu 10 min na trepačke. Octanový podiel sa zleje cez bezvodý síran sodný a extrakcia sa ešte raz zopakuje. Spojené octanové podiely sa odparia na rotačnej vákuovej odparke pri 40 °C. Odparok sa rozpustí v 1 ml metanolu a injekuje do HPLC systému.

7. Podmienky stanovenia
Kolóna: LiChroCART C – 4, 5 um (Merck)
Mobilná fáza: A: acetátový pufer pH=4,6
B: acetonitril
Prietok mobilnej fázy: 1,0 ml / min
Detekcia:scan 230 – 400 nm, (275 nm)
Teplota: 40 ^{o}C
Injekovaný objem: 25 ul

CH 6.2.
Stanovenie sulfadimidínu v premixoch a kŕmnych zmesiach

1.Určenie metódy

Metóda je vhodná na stanovenie obsahu sulfadimidínu v premixoch a kŕmnych zmesiach.

2. Princíp metódy

Vzorky sa po homogenizácii a extrakcii metanolom analyzujú HPLC metódou na RP-C18 kolónach a detegujú sa DAD detektorom pri 275 nm. Nasnímané spektrá v intervale 250 - 360 nm sa porovnávajú s kalibračnými spektrami.
Metóda je vhodná na stanovenie sulfadimidínu ako aj iných analytov zo skupiny sulfonamidov vo vzorkách krmív.

3. Pomôcky

3.1. Prístroje a zariadenia

- ultrazvukový kúpeľ
- analytické váhy
- pH meter
- trepačka
- kvapalinový chromatograf s DAD detektorom
- kolóna Nova-Pak® C18,
- automatické pipety s nastaviteľným objemom, jednokanálové
- filtračný papier
- striekačkové filtre
- mraznička (menej ako -18 ^{0}C)
- chladnička ((4±2) ^{0}C)

3.2. Chemikálie a roztoky

- metanol pre HPLC
- metanol p.a.
- acetonitril pre HPLC
- redestilovaná voda pre HPLC
- octan sodný, p.a.
- ľadová kyselina octová, 100 %, p.a.
- štandardy: sulfadimidin

4. Pracovný postup

- krmivo s výnimkou premixov tesne pred navažovaním dobre premiešať, pomleť a znovu dobre premiešať, premixy dobre premiešať
- s presnosťou na 0,1 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 metanolu , sonikovať v ultrazvukovom kúpeli 15 minút
- doplniť 0,01M acetátovým pufrom pH 4,6 po značku, premiešať

- prefiltrovať cez papierový filter, prvé podiely vyliať
- prefiltrovanú vzorku prečistiť cez striekačkový membránový filter
- aplikovať vzorku na HPLC meranie

5. Podmienky merania

Kolóna:	Nova-Pak C_{18}, 150 x 3,9 mm, 4 µm		
Teplota kolóny: 30^0C	Objem nástreku : 10 µl		
Mobilná fáza :	A	0,01M octan sodný, pH 4,6	78 %
(izokratické zloženie)	B	acetonitril	17 %
	C	metanol	5 %
Prietok mobilnej fázy :	0,7 ml/min		

Detekcia: DAD pri 275 nm (275/16, 500/100), snímanie spektier: 250 - 360 nm

6. Literatúra

Veterinární laboratorní metodiky VIII.a, Chemie potravin, Všeobecná část, Bratislava 1993, str. 32 – 35.
Metóda bola vypracovaná a validovaná pre potreby ŠVPÚ Nitra ing. B. Škarbovou.

CH 6.2.

STANOVENIE SULFONAMIDOV METÓDOU HPLC

1. URČENIE METÓDY

Skúšobná metóda je použiteľná pre stanovenie sulfonamidov v nasledujúcich komoditách: Bravčový sval, hovädzí sval, hydinový sval, mlieko čerstvé a sušené, vajcia čerstvé a sušené. Touto metódou je možné stanovenie nasledujúcich sulfonamidov:

• Sulfaguanidin
• Sulfanilamid
• Sulfadiazin
• Sulfathiazol
• Sulfapyridin
• Sulfamerazin
• Sulfamethizol
• Sulfadimidin (Sulfamethazin)
• Sulfamethoxypyridazin
• Sulfasoxazol
• Sulfamonomethoxin
• Sulfadoxin
• Sulfamethoxazol
• Sulfaquinoxalin
• Sulfadimethoxin

2. PRINCÍP METÓDY

Zhomogenizovanú vzorku opakovane extrahujeme organickým rozpúšťadlom. Po následnej centrifugácii a oddelení v deliacom lieviku extrakt prefiltrujeme cez vrstvu bezvodého síranu sodného. Eluát odparíme do sucha a zvyšok zakoncentrujeme do rozpúšťadla, ktoré zodpovedá zloženiu mobilnej fázy. Pre kvantifikáciu sa používa technika HPLC s DAD detekciou pri vlnovej dĺžke 273 nm.

3. POMÔCKY

3.1. PRÍSTROJE A ZARIADENIA

- Kuchynský mlynček, prípadne Ultra Turrax
- Ultrazvukový vodný kúpeľ
- Rotačná vákuová odparka
- Centrifúga
- Laboratórna trepačka
- Ultrazvuková vaňa
- Milli-Q-Gradient, systém na prečisťovanie destilovanej vody, Millipore
- HPLC systém HP1100 (Agilent) = kvapalinový chromatograf 1100 s quartérnou gradientovou pumpou a vákuovým degasérom + DAD detektor

3.2. CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

Všetky použité materiály a chemikálie musia byť vhodné pre HPLC analýzu (napr. LiChrosolv, Uvasol, Suprasolv)

- Ethyl acetát pre HPLC
- Acetonitril, gradiet grade
- Metanol, gradient grade
- Octan sodný.$3H_2O$, p.a.
- Síran sodný bezvodý, p.a
- Chlorid sodný, p.a.
- Kyselina octová,
- HPLC-grade H_2O, získaná prečistením destilovanej vody v zariadení Milli-Q-Gradient
- Analytická kolóna: Discovery HS F5, C18, 250 x 4.6 mm, 5µm s predkolónou
- Striekačkové membránové filtre Nylon 0.45 µm
- Roztoky: 0,01 M octan sodný s pH 4,6 (1,36g octanu sa rozpustí v 1000 ml H_2O a upraví sa pH pomocou kyseliny octovej na 4,6)

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 ≤ (- 18)°C až po analýzu.
Z uloženej laboratórnej vzorky sa odoberie 10,0 ± 0,1 g zhomogenizovanej vzorky.

Extrakcia vzorky:

Mäso:
Analyzovanú vzorku dokonale zhomogenizujeme pomocou mäsového mlynčeka a odoberieme priemernú vzorku na analýzu. Do Erlenmayerovej banky navážime 10 g, zalejeme octanom etylnatým a extrahujeme v ultrazvuku a na trepačke. Extrakt prefiltrujeme cez vatový filter a vrstvu bezvodého Na_2SO_4 . Extrakciu zopakujeme s etylacetátom. Spojený extrakt odparíme na rotačnej vákuovej odparke do poslednej kvapky. Odparok rozpustíme v mobilnej fáze (50%pufor, 25%ACN, 25%MeOH) a kvantitatívne prenesieme do centrifugačnej skúmavky. Potom banku opláchneme hexánom a pridáme ku obsahu v skúmavke. Obsah v skúmavke dôkladne pretrepeme tak, aby tuk prešiel do hexánovej fázy. Potom zmes odstreďujeme v centrifúge 10 minút pri 3000 ot./min., čím dôjde k vyčíreniu spodnej vrstvy. Spodnú vrstvu odoberieme striekačkou a prefiltrujeme cez membránový filter a takto pripravenú vzorku podrobíme HPLC analýze s DAD detekciou pri 273 nm.

Mlieko čerstvé, sušené a med:
Vzorku mlieka dokonale zhomogenizujeme. Z práškovej formy pripravíme 10% vodný roztok. Z takto pripravenej vzorky odpipetujeme 10ml a pridáme 10M kyselinu chlorovodíkovú. Po dokonalom pretrepaní a vyzrážaní bielkoviny vzorku extrahujeme etylacetátom na trepačke. Potom celý obsah banky prenesieme do centrifugačnej skúmavky a odstreďujeme 15 min pri 3000 ot./min. Supernatan zlejeme cez vrstvu síranu sodného a odparíme na vákuovej rotačnej

odparke pri teplote 40ºC do poslednej kvapky. Odparok rozpustíme v mobilnej fáze (50%pufor, 25%ACN, 25%MeOH) a kvantitatívne prenesieme do centrifugačnej skúmavky. Potom banku opláchneme hexánom a pridáme ku obsahu v skúmavke. Obsah v skúmavke dôkladne pretrepeme tak, aby tuk prešiel do hexánovej fázy. Potom zmes odstreďujeme v centrifúge 10 minút pri 3000 ot./min., čím dôjde k vyčíreniu spodnej vrstvy. Spodnú vrstvu odoberieme striekačkou a prefiltrujeme cez membránový filter a takto pripravenú vzorku podrobíme HPLC analýze s DAD detekciou pri 273 nm.

Vajcia čerstvé a sušené:
Navážime 25 g zhomogenizovanej vzorky do banky a zalejeme acetonitrilom. Vzorku extrahujeme v ultrazvuku. Extrakt opatrne zlejeme do banky cez vatový filter, k tuhej fáze pridáme ešte acetonitril a premiešame. Spojené extrakty prelejeme do deliaceho lievika, pridáme NaCL, dôkladne pretrepeme, aby sa soľ dobre rozpustila. Po oddelení vrstiev spodnú vrstvu vypustíme do pripravenej kadičky, vrchnú vrstvu prefiltrujeme cez vatový filter a vrstvu bezv. Na_2SO_4. Vodnú vrstvu opakovane extrahujeme s etylacetátom. Po oddelení vrstiev spodnú vrstvu vyhodíme a vrchnú znovu prefiltrujeme do acetonitrilovej časti. Obsah banky odparíme na rotačnej vákuovej odparke do poslednej kvapky. Odparok rozpustíme v mobilnej fáze (50%pufor, 25%ACN, 25%MeOH) a kvantitatívne prenesieme do centrifugačnej skúmavky. Potom banku opláchneme hexánom a pridáme ku obsahu v skúmavke. Obsah v skúmavke dôkladne pretrepeme tak, aby tuk prešiel do hexánovej fázy. Potom zmes odstreďujeme v centrifúge 10 minút pri 3000 ot./min., čím dôjde k vyčíreniu spodnej vrstvy. Spodnú vrstvu odoberieme striekačkou a prefiltrujeme cez membránový filter a takto pripravenú vzorku podrobíme HPLC analýze s DAD detekciou pri 273 nm.

4.2. PRÍPRAVA MERANIA

HPLC podmienky:

Mobilná fáza	A = 0,01 M roztok octanu sodného s pH 4,6 B = acetonitril
Prietok	1 ml/min
Nástrek	20 µl
Teplota kolóny	20°C
Celkový čas	40 min
Analytická kolóna	Discovery HS F5, C18, 250 x 4.6 mm, 5µm s predkolónou, SUPELCO

Lineárny gradientový program: zmenu zloženia mobilnej fázy v čase programujeme nasledovne:

Čas (min)	A %	B %
0	94	6
28	60	40
30	94	6
34	94	6

4.3. MERANIE

Extrakty vzoriek kvantifikujeme kvapalinovým chromatografom, ktorý je špecifikovaný v kap. 3.1.

5. VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV

HPLC 1100 (HP, Agilent)

Pre výpočet koncentrácie sulfonamidov používame multikalibračný program Data analysis, ktorý je súčasťou programového vybavenia pre ovládanie chromatografického systému a spracovanie chromatografických údajov LC chemstation software.
Prepočet látkovej koncentrácie na hmotnostnú:
hodnota výsledku vyjadrujeme v mg/kg vzorky podľa nasledujúceho vzorca:

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

m = hmotnosť v mg/kg (µg/g)
c = nameraná koncentrácia analytu v mg/l (µg/ml)
V = objem v ml
n = návažka vzorky v g
r = zrieďovací faktor

6. 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, 215-223