

ГРУППА КОМПАНИЙ

BCM

БИОХИММАК

закрывтое акционерное общество
БиоХимМак СТ

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта

Левомецетин в продуктах животного происхождения

Москва 2008

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении левомицетина в продуктах животного происхождения. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемых компонентов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

I. Цель и назначение Аналитического комплекта «Левомецетин в продуктах животного происхождения»

I.1. Цель выпуска комплекта «Левомецетин в продуктах животного происхождения»

Целью выпуска Аналитического комплекта Левомецетин в продуктах животного происхождения является обеспечение количественного определения методом ВЭЖХ синтетического антибиотика левомецетина (хлорамфеникола-САР, хлормецетина) в образцах мяса, молока и яиц, предельно допустимое содержание которого согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 установлено на уровне 0.01 мг/кг.

I.2. Назначение комплекта «Левомецетин в продуктах животного происхождения»

Аналитический комплект предназначен для подготовки проб, а также их количественного анализа методом ВЭЖХ в соответствии с международным стандартом (далее, "ISO 13493"):

- International standart ISO 13493:1998. Meat and meat products – Determination of chloramphenicol content – Method using liquid chromatography.

Подготовка проб мяса, молока и яиц, описанная в МУК 4.1.1912-04 «Определение остаточных количеств левомецетина в продуктах животного происхождения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноферментного анализа», М., ФЦГСЭН Минздрава России, базируется на устаревших подходах жидкостной экстракции, отличающихся многооперационностью.

Комплект впервые в отечественной аналитической практике реализует для проб всех указанных видов продуктов универсальную схему подготовки с применением принципов твердофазной экстракции (ТФЭ).

I.3. Особенности комплекта «Левомецетин в продуктах животного происхождения»

В основу подготовки проб положена приведенная в "ISO 13493" твёрдофазная переэкстракция левомецетина из водного экстракта пробы продукта животного происхождения на патроне с диатомитовой землей. Метод изократического ВЭЖХ-анализа левомецетина, приведенный в "ISO 13493", рассчитан на применение обращенно-фазовой С8- или С18- колонки малого объема (3 x 200 мм) в системе ацетонитрил-0.01М ацетатный буфер, рН 4.3, (25:75).

Реализованный в Аналитическом комплекте подход пробоподготовки и ВЭЖХ-анализа левомецетина (хлорамфеникола) обладает следующими характерными особенностями:

□ Двух- или трехстадийная подготовка проб методом твёрдофазной экстракции (ТФЭ) на одноразовых патронах ДИАПАК Д-25 и Диапак Силикагель, либо с дополнительным регенерируемым патроном Диапак ПА-3;

□ При необходимости двукратного повышения чувствительности анализа вместо патрона ДИАПАК-Д-25 следует готовить патрон ДИАПАК Д-50 из имеющегося сорбента Диасорб-1500;

□ ВЭЖХ-анализ левомецетина в градиентном режиме в системе ацетонитрил - вода с 0.05% трифторуксусной кислоты на микроколонке Диасфер-110-С18NT, 2x150 мм,

позволяющей добиться надежного отделения примесных пиков при комнатной температуре (20-25°C);

□ Градиентный режим элюирования на микроколонке дает возможность существенно снизить порог обнаружения левомицетина, если в спектрофотометрическом детекторе установлена стандартная измерительная ячейка с оптическим путем около 10 мм;

□ Детектирование левомицетина осуществляется по "ISO 13493" на длине волны 285 нм, причем стандарт рекомендует, если это возможно, использовать диодно-матричные (или другие многоволновые) детекторы, например, модели 2600 или 2900 фирмы KNAUER или другие, для спектрального подтверждения наличия антибиотика и четкой разметки хроматограммы при количественном анализе.

II. Состав комплекта ¹ «Левомицетин в продуктах животного происхождения»

1. Сорбент Диасорб-1500, 100-200 мкм, для приготовления патронов Диапак Д-25 (Диапак-Д-50) для пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), – 2 л.

2. Концентрирующие патроны Диапак Силикагель для пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), обеспечивающие подготовку не менее 80 проб – 80 шт.;

3. Концентрирующие патроны Диапак ПА-3 для пробоподготовки методом твердофазной экстракции (ТУ 4215-002-05451931-94), обеспечивающие подготовку не менее 80 проб – 4 шт.;

4. Стандартный образец левомицетина (хлорамфеникола) Eur.Pharm. – 0.2 г;

5. Аналитическая колонка ДИАСФЕР-110-С18 NT (ТУ 4215-001-05451931-94), 5-7 мкм, 2x150 мм, для ВЭЖХ-анализа;

6. Пластиковый корпус патрона – 1 шт.

7. Инструкция по применению Аналитического комплекта.

III. Порядок проведения пробоподготовки

Порядок проведения подготовки проб продуктов животного происхождения описан в полном соответствии с "ISO 13493" с дополнениями ЗАО «БиоХимМак СТ». Используются реактивы аналитической квалификации, не содержащие посторонних примесей, и бидистиллированная вода.

Отбор продуктов питания осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТов на исследуемые продукты: ГОСТ 7269-79 «Мясо», ГОСТ 7202.0-74 «Мясо птицы», ГОСТ 3622-68 «Молоко и молочные продукты». Условия упаковки, хранения и доставки образцов в лабораторию приведены в МУК 4.1.1912-04. Там же можно найти общие положения по контролю левомицетина.

III.1. Подготовка к проведению определения

III.1.1. Приготовление элюентов для ТФЭ-очистки

- Приготовить элюирующую смесь для патрона Диапак Силикагель, для чего смешать этиловый спирт и хлороформ в объемном соотношении 1:9.

¹ Примечание.

Общелабораторное оборудование и растворители в состав аналитического комплекта не входят, их варианты приведены в МУК 4.1.1912-04.

- Приготовить элюирующую смесь для патрона Диапак ПА-3, для чего смешать метиловый спирт и бидистиллированную воду в объемном соотношении 1:1.
- Приготовить регенерирующую смесь для патрона Диапак ПА-3, для чего смешать этанол и 25% водный аммиак в объемном соотношении 95:5.

III.1.2. Приготовление элюентов для ВЭЖХ-анализа

- Приготовить 1% раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) разведением 10% раствора бидистиллированной водой в объемном соотношении 1:9.
- Приготовить 0.05% раствор ТФУ разведением 1% раствора бидистиллированной водой в объемном соотношении 1:19 (элюент А).
- Приготовить смесь ацетонитрила, воды и 1% раствора ТФУ, для чего смешать составляющие в объемном соотношении 70:25:5 (элюент В).

III.1.3. Приготовление стандартных растворов левомицетина (по стандарту ISO 13493:1998)

- Приготовить основной раствор левомицетина с концентрацией 100 мкг/мл, для чего навеску левомицетина 10 мг (с точностью до 0,1 мг) поместить в мерную колбу объемом 100 мл. Добавить метанол до половины колбы и растворить левомицетин. После полного растворения довести объем до метки метанолом. Раствор храниться в темноте 1 месяц с момента приготовления.
- С помощью пипетки отобрать 5 мл раствора левомицетина и перенести в мерную колбу объемом 100 мл. Довести объем бидистиллированной водой до метки и тщательно перемешать. Стандартные растворы готовить разведением 1 мл, 2 мл, 5 мл, 15 мл этого раствора в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой для получения растворов с концентрациями 0,05 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,75 мкг/мл, соответственно. Стандартные растворы левомицетина хранят в темноте в течение 1 недели.

III.2. Предварительная подготовка пробы

III.2.1. Подготовка пробы мясных продуктов

- Из 200 г гомогенизированного образца мяса отобрать навеску 10 г и добавить 40 мл бидистиллированной воды. Измельчать на лабораторном блендере в течение 3 мин. Объем водной фазы составляет 40 мл воды плюс количество воды в мясе на каждые 10 г гомогената (около 7 мл в соответствии с табл.3 справочника “Химический состав российских пищевых продуктов”, М., ДеЛи принт, 2002)
- Отфильтровать через фильтровальную бумагу и отобрать 20 мл супернатанта.

$$M_{экв} = V_{спн} \times m / V_{водн.ф.}$$

где: $M_{экв}$ – эквивалент массы пробы мяса, взятой на анализ, г; $V_{спн}$ – объем супернатанта, мл; m – навеска образца мяса, г; $V_{водн.ф.}$ – объем водной фазы, мл.

III.2.2. Подготовка пробы молока

- К 10 г молока добавить 2 мл 1% ТФУ и нагреть до кипения (свертывания молока). Охладить и полностью (ополоснув посуду 1 мл воды) перенести в центрифужные пробирки.
- Центрифугировать при 8 тыс. об/мин в течение 15 мин. Декантировать супернатант.

- Промыть осадок небольшим (0.5-1 мл) количеством бидистиллированной воды и присоединить декантированную жидкость к супернатанту. Отобрать ровно половину полученной пробы.

Мэкв = 5 г.

III.2.3. Подготовка пробы яйца

- К 10 г веса гомогената яйца добавить 10 мл бидистиллированной воды. На водяной бане нагревать емкость с гомогенатом до свертывания белка.
- После охлаждения добавить 13 мл бидистиллированной воды, тщательно перемешать и растереть осадок и полностью (ополоснув посуду 2-3 мл воды) перенести в центрифужные пробирки.
- Центрифугировать при 8 тыс. об/мин в течение 15 мин. Декантировать супернатант, промыть осадок 0.5-1 мл воды и присоединить объем к супернатанту. Отобрать ровно половину подготовленной пробы.

Мэкв. = 5 г.

III.3. Предварительная очистка пробы

III.3.1. Подготовка к работе патрона Диапак-Д-(25 - 50)

- Для приготовления патрона Диапак Д-(25 – 50) следует измерить объем пробы, отбираемой на ТФЭ-очистку. Соотношение объем сорбента:объем пробы должно составлять приблизительно 2,5 (на 10 мл пробы – 25 мл сорбента, на 20 мл пробы – 50 мл сорбента).
- Мерным цилиндром отмерить 25 - 50 мл сорбента Диасорб-1500, уплотнив его постукиванием, перенести сорбент на стеклянный фильтр N4 и снова тщательно уплотнить его.
- Поместить на сформированный горизонтальный верхний слой сорбента плотный ватный тампон. Укрепить готовый к работе патрон Диапак Д-(25 -50) в вакуумной установке.

III.3.2. Концентрирование пробы на патроне Диапак Д-(25 -50)

- Нанести подготовленную пробу молока, мяса или яйца на патрон Диапак Д-(25-50), и дать впитаться в течение 15 мин.
- Элюировать левомецетин таким количеством этилацетата, чтобы соотношение объем сорбента:объем этилацетата составлял приблизительно 1:2, то есть с 25 мл сорбента проба смывается 50 мл этилацетата (с 50 мл - 100 мл этилацетата), медленно на слабом вакууме в отгонную колбу.
- Упарить на ротационном испарителе досуха при температуре около 50°C, при необходимости добавляя изопропанол.
- Перерастворить в 1 мл сухого (!) хлороформа пробу мяса или молока.
- Перерастворить в 3 мл бидистиллированной воды пробу яйца.

III.4. Дополнительная очистка пробы яйца

III.4.1. Подготовка к работе патрона Диапак-ПА-3

- Снять заглушки с патрона, подсоединить вакуумную линию и промыть 10 мл бидистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой до pH=4, со скоростью 1-2 капли/сек.

III.4.2. Очистка пробы яйца

- На подготовленный патрон нанести 3 мл водного раствора пробы яйца (п. III.3.2) при скорости 1-2 капли/сек, сразу начав сбор фракции левомецетина в отгонную колбу.
- Досмыть фракцию левомецетина 15 мл 50% водно-метанольной смеси из п. III.1.1.
- Упарить досуха(!) при температуре 80°C и слабом вакууме, добавляя в несколько приемов небольшое количество изопропилового спирта и после охлаждения колбы перерастворить в 1 мл сухого (!) хлороформа.

III.4.3. Регенерация патрона Диапак ПА-3

- После проведения очистки каждой единичной пробы патрон ДИАПАК ПА-3 должен быть регенерирован.
- В качестве регенерирующей смеси использовать аммиачно-этанольную смесь из п. III.1.1: 20 мл смеси прокачать через патрон при скорости не более 1-2 капель/сек.
- Отмыть патрон бидистиллированной водой, подкисленной уксусной кислотой до рН=4, в объеме около 50 мл (до нейтрального рН), оставив над фильтром слой воды около 2 см.
- Пересохший патрон отмывается подкисленной водой до исчезновения пузырьков воздуха в слое сорбента.

Не рекомендуется использовать каждый из патронов ДИАПАК ПА-3 для подготовке более, чем 20 единичных проб!

III.5. Тонкая очистка пробы

III.5.1. Подготовка к работе патрона Диапак Силикагель

- Снять с патрона заглушки и прокачать при помощи шприца с разъемом типа “Луер” 5 мл сухого (!) хлороформа при скорости 1-2 капли/сек.
- Подготовленный к работе патрон может храниться в течение одного дня, далее требуется повторение процедуры.

III.5.2. Тонкая очистка пробы

- 1 мл пробы в хлороформе из п. III.3.2 или III.4.2 нанести через пластиковый корпус-воронку (имеется в Комплекте) самотеком на подготовленный патрон Диапак-Силикагель
- Дважды последовательно ополоснуть колбу 0,5 мл сухого (!) хлороформа и нанести на патрон после прекращения скапывания предыдущей порции.
- Смыть целевую фракцию 5 мл 10% этилового спирта в хлороформе (п. III.1.1) и упарить при 50°C на ротационном испарителе.
- Перерастворить **пробу САР** в 350 мкл бидистиллированной воды.

IV. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

IV.1. Условия хроматографического анализа

Для систем непрерывного градиента (импортные хроматографы, а также отечественный “Орлант”):

- Элюенты А и В по п. III.1.2
- Градиент 20 - 50 - 100% элюента В за 0 – 15 - 20 минут при скорости 0.25 мл/мин (колонка 2x150 мм)
- Температура колонки 33-35 °С
- Длина волны детектора 285 нм.

IV.2. Подготовка хроматографа

- Установить в хроматограф колонку ДИАСФЕР- 110 -С18 NT типоразмера (2×150) мм и стабилизировать её в начальных условиях градиента на выбранной длине волны УФ-детектора.
- Идентификация левомецетина, а также количественное определение существенно облегчаются при использовании детекторов, допускающих многоволновое детектирование. Важно, чтобы приборы были оснащены программами обработки многоканальной хроматографической информации, например, “Мультихром-Спектр”.

IV.3. Градуировка хроматографа

- Градуировку подготовленного по п. IV.2. хроматографа осуществляют последовательным (не менее 3 раз) вводом 20 мкл градуировочных растворов левомецетина, приготовленных в соответствии с п. III.1.3., начиная с раствора наименьшей концентрации.
- После записи градуировочных хроматограмм проводят их математическую обработку с фиксацией времени удерживания и площади пика левомецетина. При необходимости проводят их статистическую обработку и строят градуировочные зависимости. Необходимо убедиться в линейности градуировочных зависимостей в выбранном диапазоне концентраций. В противном случае следует увеличить степень разбавления пробы бидистиллированной водой в 2-4 раза.

IV.4. Проведение ВЭЖХ-анализа

- Ввести в хроматограф нужное для статистической достоверности число раз **пробу САР** в условиях элюирования. Идентифицировать левомецетин по времени удерживания и зафиксировать площадь пика
- Рассчитать концентрацию левомецетина в пробах продуктов животного происхождения с учётом градуировочных зависимостей, полученных по п. IV.3. Сравнить полученные значения с предельно-допустимыми по нормативам СанПиН 2.3.2.1078-01 и использовать эти данные для целей сертификации.

IV.5. Расчет содержания левомецетина (хлорамфеникола) в пробе

$$W = C \times V_p \times 102 / R \times M_{\text{экв}}$$

Где: W – массовая доля левомецетина, мг/кг; C – массовая концентрация левомецетина в растворе экстракта, мкг/мл (вычисляется по градуировочной зависимости,

исходя из средней площади пика); V_p – объем раствора экстракта, мл; R – степень извлечения левомицетина на стадии пробоподготовки, % (определяется методом добавки в продукт); $M_{экв}$ – масса части пробы, взятой на анализ, г (п. III 2).

Разработал: /Васяров Г.Г./
/Алексеева Г.С./
“ “ 2007 г

Закрытое Акционерное Общество “БиоХимМак СТ”
Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ им.М.В. Ломоносова д.1 стр.11
тел. (495) 939-59-67 /офис/, факс (495) 939-58-06.