



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **92149** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61D 99/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 11320	(72) Винахідник(и): Новожицька Юлія Миколаївна (UA), Лінійчук Наталія Василівна (UA), Іванова Олена Вадимівна (UA), Ступак Оксана Михайлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.09.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.08.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.08.2014, Бюл.№ 15	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ І ВЕТЕРИНАРНО- САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРАМФЕНІКОЛУ В НЕОБРОБЛЕНИХ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТАХ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ РХ/МС/МС

(57) Реферат:

Спосіб визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу у продукції тваринного походження, в якому для дослідження беруть 2 г (2 см³) підготовленого зразка, додають 1 см³ деіонізованої води (окрім молока), екстрагують за допомогою етилацетату, центрифугують, очищують за допомогою методу рідина-рідина, центрифугують і відбирають нижню водну фазу у віалку для аналізу.

UA 92149 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема до біохімії та токсикології, і може бути використана в роботі науково-виробничих лабораторій.

Спосіб не має зареєстрованих аналогів в Україні.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки універсального та швидкого способу виявлення залишкових кількостей хлорамфеніколу у продукції тваринного походження, суттєве скорочення часу на пробопідготовку, зменшення витрат реактивів, посуду, зниження собівартості способу.

Процедурний підхід до ідентифікації хлорамфеніколу удосконаленим нами способом включає наступні елементи: для аналізу беруть $2 \text{ г} \pm 0,05$ (2 см^3) підготовленого, гомогенізованого зразка в центрифужну пробірку, додають 1 см^3 деіонізованої води (окрім молока), додають до нього 6 см^3 етилацетату та екстрагують 10 хв. при 100 об/хв. на роторному змішувачі, центрифугують 5 хв. при 14000g при температурі 4°C , переносять 5 см^3 екстракту етилацетату в чисту центрифужну пробірку на 15 см^3 та випарюють екстракт під потоком азоту при 40°C до сухого залишку, сухий залишок розчиняють в 1 см^3 ізookтану, додають 1 см^3 деіонізованої води та повільно перемішують, центрифугують 5 хв. при швидкості 3500 об/хв. при 4°C , переносять нижню водну фазу у віалку для аналізу [1].

Конфігурація рідинного хроматографа з тандемним мас-детектором "VARIAN 1200": градієнтний насос або два ізократичних, автосамплер, термостат колонок, тандемний квадрупольний мас-спектрометр / ESI готують згідно з інструкцією з експлуатації приладу та задають робочі параметри.

Конфігурація та режим роботи:

Хроматограф:	"VARIAN C18 ^M , 020*020 мм
Колонка	30°C
Температура термостата колонки	100 мм^3
Об'єм інжекції (петлі)	автоматичний
Режим введення проби	$0,3 \text{ см}^3/\text{хв}$
Витрата рухливої фази (елюенту)	деіонізована вода (А): метанол (В)
Градієнт (рухома фаза)	

Таблица 1

Співвідношення градієнтів:

Час	Деіонізована вода, %	Метанол, %
0,00 хв.	90	10
0,50 хв.	90	10
0,51 хв.	10	90
2,49 хв.	10	90
2,50 хв.	90	10
3,10 хв.	90	10

Тандемний квадрупольний мас-спектрометр:

Drying gas temperature	$+ 400^\circ\text{C}$
Drying gas pressure	18 psi
Ion Source	ESI
Polarity	negative
CID gas pressure (argon)	2 mTorr
Precursors Ions Q1	321 (CAP)
Products Ions Q3	152, 257 (CAP)

Час виходу хлорамфеніколу залежить від швидкості потоку, витрати елюенту, типу аналітичної колонки.

Умови виконання вимірювань підлягають перевірці і, при потребі, корегуванню:

- при переході на інший хроматограф;
- при заміні колонок;
- після ремонту вузлів хроматографа, що впливають на чутливість детектора.

Хроматограф градуують по градувальних розчинах хлорамфеніколу.

З метою удосконалення способу виявлення залишкових кількостей хлорамфеніколу в продукції тваринного походження нами використано декілька чинних способів запозичених в

країнах Європейського Союзу, які мають ряд недоліків, пов'язаних з тривалістю досліджень, процедурами виконання.

Отже, порівнюючи різні способи, розроблені в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ), в Національному діагностичному центрі (м. Рига) та в Національній ветеринарній лабораторії (м. Вільнюс) [2, 3, 4]

Таблиця 2

Результати порівняльного аналізу способів виявлення хлорамфеніколу

№ п/п	Характеристики	ДНДІ ЛДВСЕ Varian, Waters	Литва, м. Вільнюс	Латвія, м. Рига
1	Кількість етапів пробопідготовки	10	7/16	17
2	Витрати часу на пробопідготовку, год.	1,5-2	1,5-4,5	3,5-4
3	Тривалість аналізу на приладі, хв.	3,1-5	12	15
4	Тип аналітичної колонки	Polaris 3 C18-A 20×2.0 mm	C18 Symmetry shield column 100 mm×2.1 mm, 3.5µm particle size	Phenomenex Luna C18(2) 2×100 mm, 3 µm
5	Чутливість способу, мкг/кг	<0,3	<0,3	<0,3

Дані, наведені в таблиці. 2 свідчать про те, що спосіб, розроблений в ДНДІЛДВСЕ, придатний для всіх видів продукції (молочної, м'ясної, рибної, ячної тощо). У порівнянні з литовською методикою, яка має суттєві відмінності від способу, розробленого нами в ДНДІЛДВСЕ, в Національному діагностичному центрі м. Рига існує окрема методика для молока, молочних продуктів та для меду, м'яса та яєць. Вони є більш трудомісткі і характеризуються тривалою пробопідготовкою. Отже, спосіб, розроблений в ДНДІЛДВСЕ, є менш тривалим порівняно як з литовською, так і латвійською методиками, хоча остання також є універсальною. Чутливість усіх способів не суперечить вимогам Європейського Союзу, оскільки чутливість способів, які аналізувалися, не перевищує 0,3 мкг/кг хлорамфеніколу у продукті. Усі аналітичні колонки, які були використанні, є близькі за вартістю, але Symmetry і Phenomenex є дещо дорожчими.

Під час дослідження референс-матеріалу (Reference material № 444, lyophilized pig muscle, chloramphenicol free, sample identification № 0306; Reference material № 445, lyophilized pig muscle, contaminated with chloramphenicol, sample identification № 0032) отримано наступні результати, які наведені в таблиці 3. Зразок цього матеріалу був підготовлений відповідно до інструкції, наданої з референс-матеріалом.

Таблиця 3

Результати дослідження референс-матеріалу

	Назва хроматограми	Отримана концентрація, нг/мл	Приписне значення
1	blanc musk-1	-	<0,2
2	musk-1	9,23±0,33	8,9±0,9
3	blanc musk-2	-	<0,2
4	musk-2	9,07±0,44	8,9±0,9
5	blanc musk-3	-	<0,2
6	musk-3	8,80±0,06	8,9±0,9

Результати, отримані нами під час дослідження референс-матеріалу, є вірогідними і знаходяться в межах приписного значення. Отже, відпрацьований нами спосіб виявлення хлорамфеніколу не поступається методикам, які використовуються в лабораторіях Європейської спільноти.

Заявлений спосіб дозволяє за досить короткий проміжок часу дослідити зразок, що значно економить час, реактиви, і в свою чергу знижує собівартість дослідження.

Спосіб "Визначення хлорамфеніколу в необроблених харчових продуктах тваринного походження за допомогою РХ/МС/МС" дозволяє визначати залишкову кількість хлорамфеніколу в продуктах тваринного походження та продуктах їх переробки.

Спосіб визначення включає три основні етапи:

- екстракція залишків хлорамфеніколу етилацетатом;
- очищення екстракту шляхом рідинно-рідинного розділення;
- ідентифікація та кількісне визначення методом РХ/МС/МС.

Кількісне визначення масової концентрації хлорамфеніколу проводять методом зовнішнього стандарту за здійсненим попередньо калібруванням хроматографа за градувальними розчинами. Ідентифікацію проводять за часом утримання, наявністю відповідних іонів та співвідношенням їхньої інтенсивності.

При виконанні вимірювання хлорамфеніколу методом рідинної хроматографії з тандемним мас-селективним детектуванням необхідно дотримуватися таких умов:

- температура навколишнього середовища (18-25±2)°C;
- атмосферний тиск від 84 до 107 кПа (від 630 до 800 мм рт. ст.);
- відносна вологість повітря (при 20 °C) 40-80 %;

Підготовка проби:

Для підготовки проби потрібно відібрати достатню кількість зразка, не менше 100 г, ретельно гомогенізувати. Паралельно з досліджуванним зразком готується зразок з добавкою, проба контролю чистоти реактивів або референс-матеріалів.

1. Екстракція

1.1 Молоко, молокопродукти

1.1.1. Натуральне молоко та молокопродукти перед аналізом потрібно знежирити (процентрифугувати при 10 °C при прискоренні 3500 g, потім зібрати верхній шар жиру).

1.1.2. Сухе молоко, сироватку попередньо відновити. Для цього зважити 2 г ± 0,05 порошку молока, сироватки та розчинити в бідистильованій деіонізованій воді (сироватку розчиняють теплою водою) до об'єму 10 см³, відновлене молоко перед аналізом потрібно знежирити (процентрифугувати при 10 °C при прискоренні 3500 g, потім зібрати верхній шар жиру).

1.1.3. Для аналізу взяти 2 см³ підготовленого натурального або відновленого молока, сироватки в центрифужну пробірку на 15 см³.

1.1.4. Додати 6 см³ етилацетату та екстрагувати 10 хв. при 100 об/хв. на роторному змішувачі.

1.1.5. Центрифугувати 5 хв. при 14000 g при температурі 4 °C.

1.2. М'ясо, яйця та продукти їх переробки, мед

1.2.1. Зважити 2 г ± 0,05 гомогенізованого м'яса, яєць (білок + жовток), меду в центрифужну пробірку на 15 см³, додати 1 см³ бідистильованої деіонізованої води, змішати на вортексі.

1.2.2. Додати 6 см³ етилацетату та екстрагувати 10 хв. при 100 об/хв. на роторному змішувачі.

1.2.3. Центрифугувати 5 хв. при 14000 g при температурі 4 °C.

1.3. Сир та сирі продукти, козеїн

1.3.1. Зважити 1 г ± 0,05 гомогенізованого сиру в центрифужну пробірку на 15 см³, додати 1 см³ бідистильованої деіонізованої води, змішати на вортексі.

1.3.2. Додати 6 см³ етилацетату та екстрагувати 10 хв. при 100 об/хв. на роторному змішувачі.

1.3.3. Центрифугувати 5 хв. при 14000 g при температурі 4 °C.

2. Очищення методом рідина-рідина

2.1. Перенести 5 см³ екстракту етилацетату в чисту центрифужну пробірку на 15 см³ та випарити екстракт під потоком азоту при 40 °C до сухого залишку.

2.2. Сухий залишок розчинити в 1 см³ ізookтану.

2.3. Додати 1 см³ деіонізованої води та повільно перемішати.

2.4. Центрифугувати 5 хв. при швидкості 3500 об/хв. при 4 °C.

2.5. Перенести нижню водну фазу у віалку для аналізу.

Виконання вимірювання і обчислення результатів

$$X = \frac{C * V1 * V3}{m * V2}, \text{ де}$$

X - концентрація хлорамфеніколу в досліджуваному зразку, мкг/кг;

C - концентрація аналіту в інжектіваному екстракті досліджуваного зразка, нг/см³;

V1 - об'єм етилацетату, взятий для екстракції, см³;

V2 - об'єм етилацетату, взятий для випаровування, см³;

V3 - об'єм води, в якому перерозчиняється сухий залишок, см³;

m - наважка зразка, г.

Обчислення абсолютного відсотку повернення:

$$X = \frac{C \cdot 100}{c}, \text{ де}$$

X - абсолютний відсоток повернення дослідної речовини, %;

C - концентрація аналіту, отримана за градувальним графіком, нг/см³;

c - концентрація аналізу, додана до зразку, що аналізується, нг/см³;

Сумарну похибку знайдених значень частки хлорамфеніколу характеризують величиною

±ΔX, встановленою при метрологічній атестації методики аналізу.

Похибку результатів вимірювань масової частки хлорамфеніколу в пробі (Δ) мкг/кг обчислити за формулою:

$$\Delta = 0,01 \cdot \delta \cdot w,$$

де δ - границя відносної сумарної похибки, % P=0,95,

w - масова частка хлорамфеніколу у пробі.

Перевіряють базову лінію сигналу детектора. Базова лінія повинна бути стабільною, без різких коливань, сторонніх піків. Якщо є якісь відхилення, проводять промивку хроматографічної системи, обслуговування системи детектора, зміну складових рухливої фази.

Перевіряють контроль відхилення часу утримання та площі піка контрольного розчину. Для цього інjektують контрольний розчин хлорамфеніколу. Встановлюють час утримання, визначають площу.

Значення RSD для часу утримання не повинно перевищувати 2,5 %.

Найнижчий рівень калібрування повинен бути таким, щоб забезпечувати підтвердження, що відгук є адекватним і гарантувати, що подана межа була досягнута і щоб помилкові нульові значення не були подані в звіті.

Іони, які враховуються, повинні мати сигнал більше 3 по відношенню до шуму. Співвідношення між дочірніми іонами повинно задовольняти наступні параметри, які вказані в таблиці нижче.

Максимально дозволені відхилення для відносної інтенсивності в області техніки спектрометричного визначення маси:

Відносна інтенсивність (% основного збагачення)	LC-MS-MS (відносні)
> 50 %	± 20 %
> 20 % - 50 %	± 25 %
> 10 % - 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

При аналізі LC-MS/MS повинні бути передбачені матричні ефекти. Матричні ефекти роздивляються як пригнічення або збільшення відповіді сигналу. Матричні ефекти виникають, як правило, із-за присутності матричних елементів, які впливають на іонізацію речовин. Це впливає на кількісне виявлення та точність результатів.

Джерела інформації:

1. Gantverg A. Determination of chloramphenicol in animal tissue and urine liquid chromatography - tandem mass spectrometry versus gas chromatography - mass spectrometry / A. Gantverg, I. Shishani, M. Hoffman // *Analytica Chimica Acta*. - 2003. - P. 125-135.

2. Tamosiunas V. Julijonas Petratis, Audrius Padaraskas, Chloramphenicol determination in milk by liquid chromatography - tandem mass spectrometry / V. Tamosiunas, J. Petratis, A. Padaraskas // *Chemija*. - 2006. - Vol. 17. - P. 25-29.

3. Heitzman R.J. Veterinary drug residues. Residues in food producing animals and their products: Reference materials and methods. Oxford: Blackwell scientific publications. - 1994. - 512 p.

4. Абрамов А.В. Визначення хлорамфеніколу в продуктах тваринного походження методом рідинної хроматографії з подвійним мас-спектрометричним детектором / Методичні вказівки. - Київ. - 2008.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу у продукції тваринного походження, в якому для дослідження беруть 2 г (2 см³) підготовленого зразка, додають 1 см³ деіонізованої

води (окрім молока), екстрагують за допомогою етилацетату, центрифугують, очищують за допомогою методу рідина-рідина, центрифугують і відбирають нижню водну фазу у віалку для аналізу.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601