

STRESZCZENIE

W części wstępnej pracy przedstawiono charakterystykę pasz oraz omówiono właściwości fizykochemiczne, zakres i mechanizm działania tetracyklin. Przedyskutowano występowanie pozostałości tych związków w żywności pochodzenia zwierzęcego. Opisano zagadnienia dotyczące możliwości występowania efektów toksycznych u ludzi i zwierząt. Omówiono również wymagania analityczne dla metod potwierdzających oraz sprecyzowano ich zakres i sposób walidacji. W oparciu o dostępne piśmiennictwo zestawiono i przeanalizowano opublikowane dotychczas w piśmiennictwie naukowym metody oznaczania zawartości antybiotyków z grupy tetracyklin w paszach leczniczych oraz metody wykrywania i oznaczania niskich stężeń tych związków w paszach innych niż lecznicze.

Podjęte badania miały na celu opracowanie i ocenę metod umożliwiających oznaczenie zawartości tetracyklin w paszach leczniczych oraz wykrywanie i oznaczanie tych związków w jednym toku postępowania analitycznego. W ramach badań prace doświadczalne koncentrowały się na właściwym doborze warunków detekcji, rozdziału chromatograficznego, sposobu ekstrakcji analitów z matrycy oraz doborze warunków oczyszczania ekstraktów. Wyniki badań optymalizacyjnych wykorzystano do opracowania metody HPLC-DAD oznaczania zawartości antybiotyków w paszach leczniczych. Opracowano ponadto dwie procedury analityczne wykorzystujące technikę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas z pojedynczym kwadrupolem do oznaczania zawartości wybranych antybiotyków z grupy tetracyklin w paszach leczniczych i ich obecności w innych rodzajach pasz.

Zastosowanie chromatografii cieczowej z detekcją diodową podyktowane było tym, że jest to metoda tańsza w porównaniu z techniką spektrometrii mas. Ponadto zastosowanie detektora DAD daje sposobność identyfikacji badanych związków poprzez rejestrację ich widm UV oraz umożliwia wykrywanie kilku związków jednocześnie. Analizę antybiotyków prowadzono na chromatografii cieczowej z detektorem DAD, przy trzech optymalnych dla poszczególnych związków długościach fal wynoszących: 350, 360 i 370 nm. Spośród czterech przetestowanych kolumn chromatograficznych najlepszy rozdział analizowanych substancji uzyskano dla pasz leczniczych na kolumnie Thermo BDS C18.

W analizie oznaczania tetracyklin w paszach leczniczych zastosowano micelną fazę ruchomą składającą się z 7% butanolu, 0,02 M kwasu szczawowego i 0,03 M dodecylosiarczanu sodu, przy przepływie fazy 0,8 ml/min i temperaturze termostatu kolumny 20°C.

W procedurach wykorzystujących technikę LC-MS badania rozpoczęto od zoptymalizowania warunków pracy detektora mas. Zastosowano pozytywną jonizację przez elektrorozpraszanie. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnach w odwróconym układzie faz z wypełnieniem oktadecylowym, z zastosowaniem elucji gradientowej i fazy ruchomej składającej się z 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego i 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu.

W kolejnym etapie badań opracowano sposób izolacji tetracyklin z pasz leczniczych i innych rodzajów pasz przy użyciu ekstrakcji ciecz-ciało stałe i ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W wyniku przeprowadzonych badań nad ekstrakcją do fazy stałej stwierdzono, że najbardziej satysfakcjonujące wyniki dla badanych związków otrzymano dla kolumnienek kationowymiennych (Strata-X-CW), które zastosowano do oczyszczania tetracyklin w paszach innych niż lecznicze.

W przypadku pasz leczniczych, w których analizowane związki występują w wysokich stężeniach zastosowano oczyszczanie ekstraktu przez nylonowe filtry strzykawkowe dla techniki HPLC-DAD, natomiast dla techniki LC-MS poprzez 100-krotne rozcieńczenie ekstraktów paszowych w wodzie dejonizowanej o pierwszej klasie czystości.

Po zoptymalizowaniu warunków pracy kolumnienek, dokonano doboru warunków ekstrakcji antybiotyków z pasz leczniczych i innych rodzajów pasz. W przypadku pasz leczniczych wykazano, że najlepsze wyniki ekstrakcji daje mieszanina 0,01M buforu cytrynowego o pH 3 i acetonitrylu dla metody HPLC-DAD. Z kolei dla metody LC-MS najkorzystniejszym ekstrahentem okazała się mieszanina buforu McIlvaine'a-Na₂EDTA o pH 4 z metanolem, natomiast do ekstrakcji niskich stężeń antybiotyków z innych rodzajów pasz najlepsze efekty uzyskano dla buforu McIlvaine'a-Na₂EDTA o pH 4.

Przeprowadzone z zastosowaniem przygotowanych metod badania wpływu rodzaju próbek pasz i techniki detekcji na wynik analizy wykazały, że rodzaj

mieszanki paszowej nie ma wpływu na wynik badania. Natomiast zastosowanie tej samej metody ekstrakcji tetracyklin z pasz leczniczych dla dwóch różnych technik detekcji ma istotny wpływ na końcowy wynik analizy. W związku z tym opracowano nową metodę ekstrakcji TCs z próbek pasz leczniczych umożliwiającą uzyskanie wyższych odzysków substancji czynnych z zastosowaniem chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Opracowane procedury zostały w pełni zwalidowane zgodnie z wymaganiami określonymi w Decyzji Komisji 2002/657/EC, spełniają kryteria analityczne i umożliwiają oznaczenie tetracyklin w paszach leczniczych oraz innych rodzajach pasz.

Opracowane metody analityczne przygotowano w formie procedur badawczych, które zostaną wdrożone do badań w ramach Krajowego Planu Urzędowej Kontroli Pasz w Polsce.

SUMMARY

In the initial part of the study one presents characteristics of the feeds and discusses the physicochemical properties, the extent and mechanism of action of tetracyclines. One also discussed the presence of residues of these compounds in foods of animal origin, and the issues concerning the possibility of the occurrence of toxic effects in humans and animals. The paper also discusses the analytical requirements for confirmatory methods and clarifies their scope and validation procedure. Based on the available scientific literature, the previously published described methods for the determination of the tetracycline antibiotics in animal feed, and methods for the detection and determination of low concentrations of these compounds in non-target feed were compiled and analyzed.

The study aimed the development and evaluation of methods for determination of tetracyclines content in animal medicated feed and the detection and determination of low levels of these compounds in a single analytical proceedings. Within this study, experimental works have focused on the appropriate selection of the detection conditions, chromatographic separation, extraction method of the extraction of analytes from the matrix and the choice of purification conditions for extracts. The optimization test results were used to develop of high pressure liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) method for the determination of antibiotics contents in medicated feedingstuffs. Moreover, two analytical procedures were developed using the technique of liquid chromatography with mass spectrometry (LC-MS) with a single quadrupole for the determination of the content of certain antibiotics of tetracycline group in medicated feedingstuffs and their residues in other types of non-target feed.

The use of liquid chromatography with diode detection was dictated by the fact that this method is cheaper compared with mass spectrometry techniques. Furthermore, the use of DAD detector provides an opportunity to identify test compounds by recording their UV spectra and allows detection of several compounds simultaneously. Antibiotics analysis was performed on liquid chromatograph with DAD detector at three optimum wavelengths for the individual compounds and were: 350, 360 and 370 nm. From among the four

chromatographic columns tested, the best separation of the analysed substances was obtained on a Thermo BDS C18 column. In the analysis of the determination of tetracyclines in medicated feedingstuffs the micellar mobile phase, consisting of 7% of butanol, 0.02 M of oxalic acid and 0.03 M of sodium dodecyl sulfate was used, with the phase flow of 0.8 ml / min and a column thermostat temperature of 20°C. In procedures based on the LC-MS technique, the study began from optimization of the working conditions of the mass detector. The positive electrospray ionization was applied. Chromatographic separation was performed on octadecyl-filled reversed phase column, using a gradient elution and a mobile phase consisting of 0.1% of aqueous formic acid and 0.1% of formic acid in acetonitrile.

In the next stage of the research, a method of isolation of tetracyclines from medicated feedingstuffs and other feeds using a liquid-solid and solid phase extraction (SPE) were elaborated. As a result of research on a solid phase extraction it was found that the most satisfactory results were obtained for cation exchange cartridges (Strata-X-CW), which were used to purify the tetracyclines in non-target animal feed. In case of medicated feeds in which the analyzed compounds are used in high concentrations, purification of the extract through a nylon syringe filters for HPLC-DAD and for the LC-MS 100-fold dilution of the feed extract in deionized water of the first class of cleanliness was applied.

After optimizing the working conditions of the SPE cartridges, one selected the antibiotics extraction conditions from medicated feedingstuffs and other types of feed. In case of medicated feeds it has been shown that the best results of extraction were obtained with the mixture of 0.01 M citrate buffer of pH 3 and acetonitrile in case of HPLC-DAD method. In turn, for the LC-MS method, the most preferred extraction solvent was a mixture of Na₂EDTA – Mcllvaine buffer of pH 4 and methanol, and for the extraction of low levels of antibiotics from other feeds the best results were obtained for Na₂EDTA – Mcllvaine buffer at pH 4.

The research carried out using the developed methods for the assessment of the influence of the feed type and detection techniques on the results of the analysis showed that the type of feed does not affect the test results. However, the detection technique used for the the analysis of the tetracyclines extracted with the same method from medicated feedingstuffs has a significant impact on the find

result of analysis. The study performed has given the base for the development of the new procedure for the determination of tetracyclines in medicated feed using LC-MS technique and different extraction method of the active substances from the feed matrix. The developed procedures were fully validated in accordance with the requirements set out in the Council Decision 2002/657/EC, they meet the analytical criteria and allow the determination of tetracyclines in animal medicated feed and in other types feed.

The elaborated analytical methods were prepared in the form of laboratory procedures to be implemented in the framework the National Plan of Official Control of Feed in Poland.