

to vaccination against Equid herpesvirus 1 in horses 213–217., PMID: PMC1899868 Can J Vet Res. 2007 July; 71(3). 6. Laura B Goodman, Arianna Loregian, Gillian A Perkins, Josie Nugent, Elizabeth L Buckles, Beatrice Mercorelli, Julia H Kydd, Giorgio Palù, Ken C Smith, Nikolaus Osterrieder, and Nicholas Davis-Poynter-A Point Mutation in a Herpesvirus Polymerase Determines Neuropathogenicity-2007 November; 3(11): e160, PMID: PMC2065

EPIZOOTOLOGY, DIAGNOSTICS AND PROPHYLAXIS OF MAIN HORSE VIRAL DISEASES

Yurov K.P.

All-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Medicine
named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Up-to date data on epizootology, diagnostics and methods of control of the most spread horse infectious diseases (herpesvirus infections, influenza, viral arteritis ant others) is presented in the paper.

УДК 619:615.9:632.95

ВСТАНОВЛЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ПАРАМЕТРІВ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДЕЛЬТАМЕТРИНУ В МОЛОЦІ СПОСОБОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Ярошенко М.О.

ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Наведені результати досліджень зі встановлення валідаційних параметрів удосконаленого методу визначення залишкових кількостей дельтаметрину в молоці способом тонкошарової хроматографії. Встановлено, що метод для даного аналізу є специфічним (селективним), лінійним, межа детектування становить 0,3 мкг/мл, межа визначення 0,1 мг/л.

Розроблення нових або удосконалення існуючих методів визначення залишкових кількостей хімічних сполук, що використовуються в лабораторіях, відповідно до стандарту ISO 17025 та європейської інструкції ЕС 657/2002, повинні бути валідовані. Валідаційні параметри допомагають встановити характеристики та обмеження методу, своєчасне виявлення й усунення впливів, що можуть змінювати ці характеристики. Валідація – це процес підтвердження придатності методу відповідним задачам, тобто використання його для рішення специфічних аналітичних проблем. А саме – контролю специфічності, точності та правильності, внутрішньолабораторної відтворюваності, стабільності аналізу в розчині та матриці, лінійності, меж детектування та визначення даного методу тощо [1, 2, 3, 4, 5].

У зв'язку з цим, метою наших досліджень було встановлення валідаційних параметрів удосконаленого методу визначення залишкових кількостей дельтаметрину в молоці способом тонкошарової хроматографії.

Матеріали та методи. Валідаційні параметри методу визначали в лабораторії безпеки та якості сільськогосподарської продукції ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

Для досліджень використовували: стандартні розчини дельтаметрину на н-гексані у концентраціях 10 та 100 мкг/см³, платівки для тонкошарової хроматографії «Реасорб» УФ 254 з алюмінієвою підложкою та шаром сорбенту силікагелю КСКГ, систему розчинників, що рухаються – н-гексан-ацетон у співвідношенні 5:1; проявляючий реагент – 1,5 % ацетоновий розчин бензидину. Матрицею слугувало коров'яче молоко з 2,5 % вмістом жиру.

Результати досліджень

- Встановлення специфічності методу проводили на 10 визначеннях аналізу у зразку матриці, в якій даний аналіт не містився. Після проведення досліджень у зразках матриці дельтаметрин виявлено не було, тобто даний метод визначення дельтаметрину є специфічним (селективним).

- Точність методу визначали кількісно у 20 дослідях, за умов додавання аналіту до матриці, у якій не містився даний аналіт і в якій вже містилась визначена його кількість. За результатами досліджень процент повернення добавки аналіту до матриці, яка не містила аналіт склав 68,8 %, а процент повернення добавки аналіту до матриці, яка містила визначену його кількість – 89,8 %. Це вказує, що наш метод визначення є точним.

- Правильність методики встановлювали шляхом аналізу модельних зразків із відомими концентраціями інсектициду та добавок, виготовлених зі стандартних розчинів. За отриманими даними, довірчий інтервал для середнього проценту повернення склав від 89,303 до 89,465, тобто близькість до нуля систематичної похибки результатів досліджень, що є задовільною характеристикою.

- Контроль відтворюваності проводили на зібраному молоці з 2,5 % жиру, шляхом прототування 3 серій по 8 зразків у кожній. Серії, у свою чергу, розбивали на 2 частини. У дослідні зразки вносили по 1 мл стандартного розчину дельтаметрину на н-гексані з концентрацією 10 мкг/мл, тобто 10 мкг інсектициду в кожний зразок.

Встановили, що зміна умов екстракції (30 хвилин на електромеханічному струшувачі та 16-18-годинне екстрагування за кімнатної температури), використання молока з різним вмістом жиру (зібране молоко 2,5 та 3,2 % вмістом жиру) істотно не вплинули на якість результатів вимірювань.

За умов зміни часу виморожування жирів (протягом 3 та 16-18 годин) встановили, що виморожування впродовж 3 годин є оптимальним, а більш тривале виморожування призвело до зменшення кількості дельтаметрину у зразку.

- Для визначення стабільності аналіту в розчині приготували стандартний розчин дельтаметрину 100 мкг/мл та провели хроматографування стандарту в десяти повторюваностях, шляхом нанесення на платівку «Реасорб» у кількості 0,1 мл – 10 мкг, відповідно до методу визначення, інсектицид проявився у вигляді темно-синіх плям на жовто-коричневому фоні.

Після цього основний стандартний розчин аналіту розділили на 40 аліквот та зберігали в різних умовах: 10 – у посуді з темного скла за температури – 20 °С; 10 – у посуді з темного скла за температури 4 °С; 10 – у посуді з темного скла за температури 20 °С; 10 аліквот – у посуді зі світлого скла за температури 20 °С. Визначили, що концентрація аналіту в розчинах за умов зберігання в посуді з темного скла за температури 4 °С та 20 °С протягом двадцяти восьми діб значно не зменшилась. Розпад інсектициду спостерігався в умовах зберігання аналіту в посуді з темного скла за температури – 20 °С та посуді із світлого скла за температури 20 °С.

- Визначення стабільності аналіту в матриці проводили на зібраному молоці з 2,5 % вмістом жиру з додаванням відомої кількості аналіту. Зразки матриці зберігали за температури – 20 °С та досліджувались через 7, 14, 28 діб. За результатами досліджень стабільність аналіту в матриці спостерігалась протягом 14-ти діб, на 28-му добу дельтаметрин не ідентифікувався.

Контроль лінійності визначали шляхом приготування та нанесення на хроматографічну платівку розчину аналіту (дельтаметрину) з різним його вмістом – 1, 5, 10, 15 та 20 мкг, після чого побудували калібрувальний графік залежності площі піка від концентрації інсектициду (рис.). Отримані результати вказують, що метод є лінійним.

- Повторюваність методу визначали, шляхом досліджень близькості результатів фактичного вмісту аналіту в 10-ти зразках. Ця характеристика вважається прийнятною в межах 0,01–0,5 мг/кг, коли значення (RSD) не > 20. За отриманими даними, відносне стандартне відхилення збіжності 10 вимірювань, проведених за нашим методом, становить 8,29 %, що є задовільним результатом.

- Межу детектування нашого методу визначали, шляхом нанесення на хроматографічну платівку 10 зразків стандартного розчину дельтаметрину у н-гексані з концентрацією 10 мкг/мл. Встановили, що межа детектування методу визначення дельтаметрину була статистично вірогідною та становила 0,3 мкг/мл.

- Межу виявлення методу (мг/л) визначали за допомогою додавання розчину аналіту (дельтаметрину) до 10 зразків матриці (молоко), яка не містила даного аналіту, з таким розрахунком, щоб концентрація аналіту в кінцевому розчині дорівню-

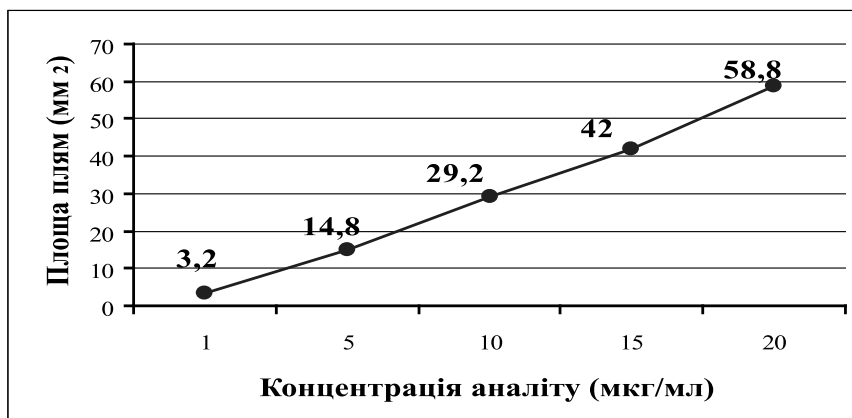


Рис. Калібрувальний графік лінійності методу визначення дельтаметрину способом тонкошарової хроматографії

вала межі детектування даного методу та провели дослідження за нашим методом. Після визначення концентрації аналіту у кожному зразку та середнього значення, встановили, що межа виявлення методу становить 0,1 мг/л.

• Після обчислення середнього квадратичного відхилення невизначеність результатів нашого методу визначення дельтаметрину у молоці способом тонкошарової хроматографії становить 0,007.

Висновки. Таким чином, відповідно до стандарту ISO 17025 та європейської інструкції ЕС 657/2002, були встановлені валідаційні характеристики удосконаленого методу визначення залишкових кількостей дельтаметрину у молоці способом тонкошарової хроматографії. Встановлено, що метод є специфічним (селективним), лінійним, межа визначення становить 0,1 мг/л, межа детектування 0,3 мкг/мл і його можна рекомендувати для використання у хіміко-токсикологічних лабораторіях ветеринарної медицини.

Список літератури

1. General Chapter <1225>, Validation of compendial methods, United States Pharmacopeia XXIII, National Formulary, XVIII, Rockville, MD.- The United States Pharmacopeial Convention, 1995. – P. 1710–1712.
2. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, ICH-Q2A. – Geneva, 1995.
3. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures: Methodology, ICH-Q2B. – Geneva, 1996.
4. General Chapter <1225>, Validation of compendial methods, United States Pharmacopeia XXV, National Formulary, XXV, Rockville, MD.- The United States Pharmacopeial Convention, 2002. – P. 2256–2259.
5. Кудан, О., Малінін, О., Новожицька Ю. Методичні підходи при експериментальному дослідженні валідаційних характеристик методик із визначення залишкових кількостей токсикантів в об'єктах тваринного походження. // Ветеринарна медицина України: наук-вироб. щомісячник. – Київ, 2005. – №4. – С. 36-39.

ESTABLISHMENT OF VALIDATIONS PARAMETERS OF THE METHOD OF DETECTION OF DELTAMETHRIN RESIDUAL QUANTITIES IN MILK BY THE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY WAY

Yaroshenko M.O.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

Results of researches concerning establishment of validation parameters of advanced method of research of deltamethrin residual quantities in milk by the thin-layer chromatography are resulted. It has been established, that the method is specific (selective), linear, the border of detection is equal 3 mkg, the border of detection is 0,1 mg/l.