

PREHĽAD ANALYTICKÝCH METÓD NA STANOVENIE POLYÉTEROVÝCH ANTIBIOTÍK

MILOŠ BLAZSEK

Úsek výskumu a vývoja, Biotika a.s., 976 13 Slovenská Lupča, Slovenská republika
e-mail: blazsek@biotika.sk

Došlo 26.10.01, prepracované 25.4.02, prijaté 25.9.02.

Kľúčové slová: prehľad, polyéterové antibiotiká, salinomycín, narazín, monenzín, lasalocid, analytické stanovenie, mikrobiologické stanovenie, spektrofotometria, kvapalinová chromatografia, TLC, HPLC, ELISA

Obsah

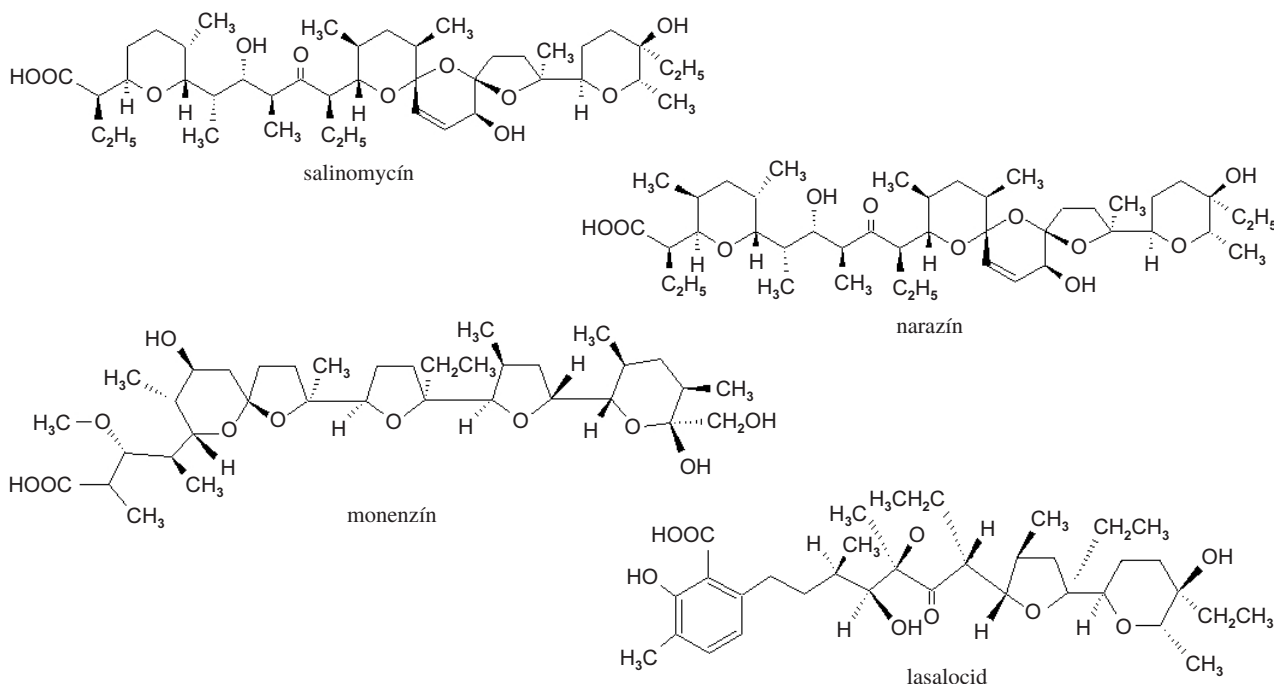
1. Úvod
2. Mikrobiologické stanovenie
3. Spektrofotometrické stanovenie
4. Tenkovrstvová chromatografia (TLC)
5. Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)
 - 5.1. HPLC s pokolónovou derivatizáciou
 - 5.2. HPLC s predkolónovou derivatizáciou
 - 5.3. HPLC s hmotnostnou detekciou
6. Imunochemické metódy – ELISA
7. Záver

1. Úvod

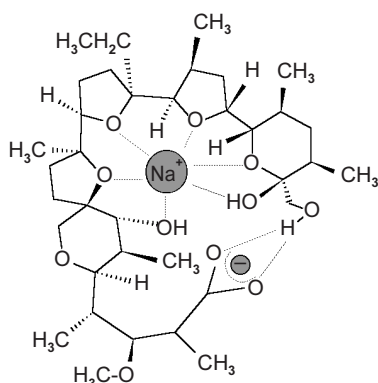
Salinomycín, narazín, monenzín a lasalocid (obr. 1) patria medzi polyéterové antibiotiká (PA), ktoré reprezentujú významnú skupinu ionofórnych zlúčenín, produkovaných kmeňmi *Streptomyces*.

Ich antimikrobiálne vlastnosti sa využívajú vo veterinárnej praxi pri liečbe a prevencii kokcidiózy u hydiny a tiež pôsobia ako stimulátory rastu u dobytky. Ako ich pomenovanie napovedá, základom chemickej štruktúry týchto zlúčenín sú cyklické éterové skupiny: tetrahydrofuranové a tetrahydropyránové kruhy, ktoré sú navzájom spojené uhlíkovým reťazcom, priamou C–C väzbou, alebo spoločným článkom – spiroatómom. Spoločnou vlastnosťou PA je prítomnosť voľnej karboxylovej skupiny na konci molekuly, prevládajúci počet naviazaných nepolárnych etyl- a metylskupín, ako aj prítomnosť polárnych kyslíkových skupín, umožňujúcich vznik elektroneutrálnych pseudo-makrocyclických komplexov s monovalentnými a divalentnými kationmi. Komplexy sú tvorené intramolekulovou vodíkovou väzbou medzi karboxylovou skupinou na jednom konci a hydroxylovou skupinou na druhom konci molekuly (obr. 2).

Väčšina PA sú biele kryštalické zlúčeniny s molovými hmotnosťami v rozmedzí 600 až 900 a s teplotami topenia okolo 100–120 °C (cit.¹). Z chemickeho hľadiska ich možno zaradiť medzi slabé karboxylové kyseliny s lipofilnými vlastnosťami. Sú nerozpustné vo vode, ale rozpustné vo väčšine organických rozpúšťadiel. Ich soli vykazujú podobnú rozpustnosť ako voľné kyseliny.



Obr. 1. Chemická štruktúra karboxylových polyéterových antibiotík



Obr. 2. Schématické zobrazenie štruktúry sodného komplexu monenzínu

Tabuľka I

Toxicita polyéterových antibiotík (v mg.kg⁻¹ váhy zvierafa) podľa Amerického výboru pre veterinárnu toxikológiu

Antibiotikum	Toxicita			
	kone	hovädzí dobytok	ovce	kuratá
Monenzín	2–3	20–80	12	200
Salinomycín	0,6	–	–	44,3
Lasalocid	21,5	50–150	75–350	71,5

Polyéterové antibiotiká sú charakteristické biologickou aktivitou proti baktériám kmeňa *kokcidia* (druh protozoa baktérii), ktoré parazitujú na epiteliálnych bunkách zažívacieho traktu vtákov a cicavcov¹. Príčinou biologickej aktivity PA sú ich iónofórne vlastnosti, to znamená schopnosť vytvárať s iónmi alkalických kovov voľné komplexy, ktoré potom môžu prenášať cez bunkové steny baktérii, a tak narušovať rovnováhu medzi vonkajším prostredím a vnútrom bunky.

Príprava a vlastnosti prvých polyéterových antibiotík boli popísané už v 50. rokoch 20. storočia (nigericín). V súčasnosti sa odhaduje, že bolo pripravených asi 80 rôznych polyéterových antibiotík, z ktorých však len malé množstvo našlo praktické uplatnenie pri liečbach chorôb hospodárskych zvierat. Medzi komerčne najvýznamnejšie patrí: salinomycín, monenzín, narazín a lasalocid. Z týchto antibiotík salinomycín a monenzín majú v súčasnosti až 65–75 % podiel na celosvetovej spotrebe polyéterových antibiotík. Väčšina PA je pripravovaná fermentačným procesom, salinomycín je produkovaný kultúrou *Streptomyces albus* a monenzín kultúrou *Streptomyces cinnamonensis*. Do medikovaných krmných zmesí sa pridávajú na koncentračnej úrovni 60–120 mg.kg⁻¹. Určité obmedzenie klinického používania PA je spôsobené ich toxickými vlastnosťami (hodnota LD₅₀ sa pohybuje v rozmedzí 1–60 mg.kg⁻¹). V tabuľke I sú uvedené toxické koncentrácie monenzínu, salinomycínu a lasalocidu pre kone, dobytok, ovce a kuratá podľa Amerického výboru pre veterinárnu toxikológiu².

Salinomycín je už v malej koncentrácii toxický pre kone

a morky, a negatívne ovplyvňuje rast hydiny³ pri koncentráciách vyšších ako 100 mg.kg⁻¹. Z tohoto hľadiska je prirodzená potreba identifikácie a kvantitatívneho stanovenia polyéterových antibiotík v medikovaných krmivách.

V dostupnej literatúre je popísaný pomerne veľký počet biologických a chemických analytických metód pre stanovenie komerčne používaných polyéterových antibiotík. Najčastejšími aplikáciami je analýza PA vo veterinárnych produktoch, krmných zmesiach a premixoch krmných zmesí. Presné stanovenie obsahu v týchto zmesiach je dôležité vzhľadom na spomenuté toxické účinky vyšších koncentrácií PA. Na druhej strane nadmerné používanie PA môže viesť nielen k vzniku bakteriálne rezistentných kmeňov, ale aj k environmentálnemu znečisteniu v podobe ich reziduí v živočíšnych produktoch. Možno preto očakávať stupňujúci sa tlak kontrolných úradov na sledovanie reziduí PA v spotrebných produktoch. Napríklad v súčasnosti je v Japonsku stanovený maximálny povolený limit 0,05 µg salinomycínu v jednom grame živočíšneho tkaniva⁴. V poslednej dobe sa aj z tohto dôvodu stále viac publikovaných prác zameriava práve na riešenie problémov spoľahlivej analýzy reziduí PA v živočíšnych produktoch (v mäse, pečeni, vajciach, mlieku, krvnej plazme a podobne).

2. Mikrobiologické stanovenie

Mikrobiologické stanovenie predstavuje pôvodnú, historicky najstaršiu metódu stanovenia PA. Biologická účinnosť antibiotika sa stanovuje porovnaním inhibície rastu citlivých mikroorganizmov spôsobenej známymi koncentraciami testovaného antibiotika v analyzovanej vzorke. Stanovenie sa vykonáva difúznou, alebo turbidimetrickou metódou. Pri stanovení PA difúznou platňovou metódou sa používa kmeň *Bacillus subtilis*. V tomto prípade sa účinnosť antibiotika vyhodnocuje na základe priemerov inhibičných zón na platni s naočkovanou živnou pôdou⁵. Princípom turbidimetrickej metódy je zase sledovanie zákalu naočkovanej živnej pôdy po určitom čase inkubácie. Pri stanovení PA sa používa kmeň *Streptococcus faecalis*⁶. Hoci sa mikrobiologické stanovenia vyznačujú množstvom nedostatkov (nízkou selektivitou, prácnosťou, dlhým časom analýz) stále patria medzi metódy stanovenia účinnosti mnohých komerčne používaných PA v krmivách požadované štátnymi autoritami a sú uvedené medzi metódami AOAC, ale aj napríklad vo Vestníku Ministerstva pôdohospodárstva SR (cit.⁷). Postupom času sú nahrádzané modernejšími metódami poskytujúcimi spoľahlivejšie výsledky za kratší čas (napr. kvapalinová chromatografia).

3. Spektrofotometrické stanovenie

Spektrofotometrické stanovenie monenzínu bolo Golabom a spol.⁸ navrhnuté ako náhrada mikrobiologického stanovenia. Metóda je založená na chemickej reakcii monenzínu s vanilínom (4-hydroxy-3-metoxibenzaldehyd) v kyslom prostredí za vzniku intenzívne sfarbeného produktu ($\lambda_{\max} = 520$ nm). Táto farebná reakcia je označovaná ako Komarovského a obecné ide o reakciu vyšších alkoholov s aromatickými aldehydmi za vzniku farebných aldolových kondenzačných produktov. Pri stanovení autori⁸ použili 3% metanolový roztok vanilínu

okyslený kyselinou sírovou. Analyt extrahovali zo vzoriek kŕmnych zmesí, premixov a fermentačných pôd do metanolu. Autori popisujú dobrú koreláciu nameraných hodnôt s mikrobiologickým stanovením. Minimálny limit stanovenia monenzínu je uvedený na úrovni $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Spektrofotometrické stanovenie salinomycínu v kŕmnych zmesiach je uvedené vo Vestníku ministerstva pôdohospodárstva SR (cit.⁷) ako alternatívna metóda mikrobiologického stanovenia. Spektrofotometrické stanovenie má oproti mikrobiologickým metódam výhodu predovšetkým vo svojej rýchlosti, no taktiež ako mikrobiologické stanovenie má nízku špecifickosť, takže nie je vhodné pri analýzach vzoriek, ktoré obsahujú viacero PA. V tomto prípade je potrebné použitie selektívnejších techník.

4. Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

Technika TLC predstavuje rýchlu a selektívnu možnosť identifikácie a semikvantitatívneho stanovenia PA a príbuzných látok v rôznorodých matriciach. Na ich detekciu sa využíva predovšetkým bioautografia a chemická reakcia s vanilínom poskytujúca farebný derivát. Martinez a Shimoda v roku 1983 použili techniku TLC na semikvantitatívne stanovenie monenzínu vo vzorkách kŕmív⁹ a kuracej a hovädzej pečeni¹⁰. Príprava vzorky spočívala v extrakcii monenzínu do vodného roztoku metanolu (80 % v/v), ktorý bol následne čistený na kolóne naplnenej oxidom hlinitým (alumina). Analyt bol reextrahovaný do dichlórmetánu a prečistený na kolóne naplnenej Sephadexom LH-20. Takto pripravenú vzorku Martinez a Shimoda analyzovali na silikagélovej platni K-6 Whatman mobilnou fázou dichlórmetán–metanol (9:1). Použitím bioautografickej detekcie kmeňom *Bacillus subtilis* dosiahli detekčný limit $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppb). V tom istom období popísal poľský autor Karkocha TLC stanovenie monenzínu s vanilínovou detekciou v živočíšnych vzorkách, v mäse hydiny¹¹, vo vajciach¹² a v mlieku¹³. Použitím dvojrozmernej elučnej techniky, keď silikagélovú platňu vyvíjal najprv zmesou chloroform:etanol:benzén (36:1:4) a následne etylacetátom, sa mu podarilo v týchto vzorkách detegovať monenzín na úrovni 4–5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Simultánna detekcia prítomnosti monenzínu, narazínu, salinomycínu a lasalocidu na TLC platni s nanoseným oxidom hlinitým (alumina) vo vzorkách premixov a kŕmív je popísaná v práci Owlesa¹⁴. Bioautografickou detekciou (*Bacillus subtilis*) sa mu podarilo 10 násobne znížiť detekčný limit na hodnotu $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (ppm), porovnaním s detekciou pomocou vanilínového činidla ($30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Japonskí autori Asukabe a spol. publikovali v roku 1987 veľmi citlivé HPTLC stanovenie derivátov salinomycínu, monezínu a lasalocidu¹⁵. Fluorescenčne aktívne pyrénacyl estery polyéterových antibiotík pripravili pomocou 1-brómacetylpyrénu. Na separáciu esterov autori použili vysokoúčinné silikagélové a reverzné C18 fázy. Spôľahlivosť stanovenia zvýšili použitím interných štandardov, 18,19-dihydrosalinomycínu a 18,19-dihydro-20-ketosalinomycínu, ktoré boli synteticky pripravené zo salinomycínu. Fluorescenčná detekcia umožnila stanovenie antibiotík v rozsahu 2–14 ng, pričom hmotnostný detekčný limit antibiotík bol len 100 pg. Okrem uvedených detekčných spôsobov navrhli Blomkvist a spol. pri TLC stanovení monenzínu off-line detekciu hmotnostnou spektrometriou¹⁶. Po separácii vzorky na silikagélovej TLC platni izolovali škrvnu monenzí-

nu a analyt vymyli do metanolu. Antibiotikum ionizovali bombardovaním rýchlymi atómami xenonu s energiou 6 keV, pričom sa sledoval vznik iónov pri $m/e = 693$ a 694 . Monenzín bol touto technikou stanovený na úrovni $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

Také prednosti tenkovrstvovej chromatografie, ako sú rýchlosť a dostupnosť analýz, zabezpečili jej využívanie aj v súčasnosti, hlavne pri identifikácii a monitorovaní prítomnosti polyéterových antibiotík v kŕmivách^{17–19} a živočíšnych tkanivách²⁰. V roku 1998 Landgraf a Ross použili TLC metódu na dôkaz prítomnosti monenzínu vo vzorkách kŕmív určených pre kone¹⁷. Z metanolového extraktu kŕmiva monenzín reextrahovali do hexánu, a reextrakt prečistili na silikagélovej SPE kolónke. Prečistenú vzorku analyzovali na silikagélovej TLC platni, použitím etylacetátu, dichlórmetánu a amoniaku ako mobilnej fázy (17:3:0,5). Monenzín detegovali chemicky benzaldehydovými činidlami. Autori boli navrhnutým postupom schopní pozitívne dokázať prítomnosť monenzínu v kŕmivách s minimálnou koncentráciou $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, pričom so stanovením neinterferovalo 36 iných antibiotík. Detekčný limit na tejto úrovni prezentoval aj Gafner, ktorý ale prítomnosť salinomycínu, narazínu a monenzínu v kŕmivách a v kŕmnych premixoch detegoval bioautograficky, použitím kmeňa *Bacillus subtilis*¹⁸. Využitie TLC metódy pri sledovaní prítomnosti reziduí salinomycínu, monenzínu a lasalocidu vo vzorkách tkanív hydiny popísali vo svojej práci VanderKop a MacNeil²⁰. Sledované antibiotiká extrahovali zo vzoriek tkaniva do metanolu a na prečistenie použili reextrakciu do chloridu uhličitého. Reextrakty analyzovali na silikagélovej platni s mobilnou fázou etylacetát:acetonitril (1:1). Antibiotiká detegovali bioautograficky kmeňom *Bacillus subtilis*. Uvedeným postupom sa im podarilo dokázať prítomnosť salinomycínu a lasalocidu na úrovni $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a monenzínu $0,45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Hlavné obmedzenie tenkovrstvovej chromatografie je predovšetkým v nízkej spoľahlivosti pri kvantifikácii analytov. Preto sa v prípade potreby presnej kvantifikácie používajú spoľahlivejšie metódy (napr. kolónová kvapalinová chromatografia).

5. Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Technika HPLC patrí v súčasnosti medzi najrozšírenejšie metódy používané na potvrdenie prítomnosti a kvantitatívne stanovenie polyéterových antibiotík v komplexných matriciach. Separácia sa väčšinou robí na analytických kolónach naplnených silikagélom s chemicky viazanou nepolárnou oktylovou (C8) alebo okta-decylovou skupinou (C18). Vzhľadom na lipofilný charakter PA sa pri analýzach používajú mobilné fázy s vysokým obsahom organickej zložky (>90 obj.% metanol, acetonitril). Keďže väčšina PA vo svojej štruktúre neobsahuje výrazné chromofóry ani elektrochemicky či fluorescenčne aktívne skupiny (okrem lasalocidu), na zvýšenie citlivosti detekcie sa používajú pred- alebo pokolónové derivatizačné reakcie. Cieľom využitia týchto reakcií je príprava derivátu s vyššou odozvou v UV alebo VIS oblasti, resp. derivátu s fluorescenčne aktívnou skupinou. Ďalším riešením je on-line spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS). V niektorých typoch vzoriek bola odskúšaná aj priama detekcia antibiotík refraktometricky alebo

spektrofotometricky v UV oblasti pri nízkych vlnových dĺžkach (nešpecifická detekcia pri 200–220 nm). Refraktometrickú (RI) detekciu použili pri stanovení salinomycínu HPLC vo vzorkách krmív a biomasy *Dimenna* a spol.²¹ Acetonitrilové extrakty vzoriek analyzovali na analytickej kolóne s reverznou fázou C8. Ako mobilnú fázu použili zmes acetonitrilu a vody okyslenej kyselinou fosforečnou (85:15). Analyzované vzorky obsahovali salinomycín na koncentračnej úrovni rádo vo $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. V roku 1993 porovnávali Beran a Zima priamu UV detekciu pri 210 nm s RI detekciou pri stanovení monenzínu HPLC v produkčných fermentačných pôdach kultúry *Streptomyces cinnamonensis*²². Na separáciu použili kolónu s reverznou fázou C18, analyty eluovali 88% metanolom. Priama UV detekcia sa za použitých podmienok ukázala málo vhodná, kvantitatívne stanovenie rušilo množstvo interferujúcich zložiek, ktoré mali absorbciu v sledovanej oblasti. Na druhej strane tieto látky mali nízku odozvu pri detekcii RI, čo umožnilo kvantitatívne stanovenie monenzínu A a monenzínu B. Koncentrácia monenzínu v stanovovaných vzorkách sa takisto pohybovala na úrovni $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, pričom detekčný limit metódy bol $1\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

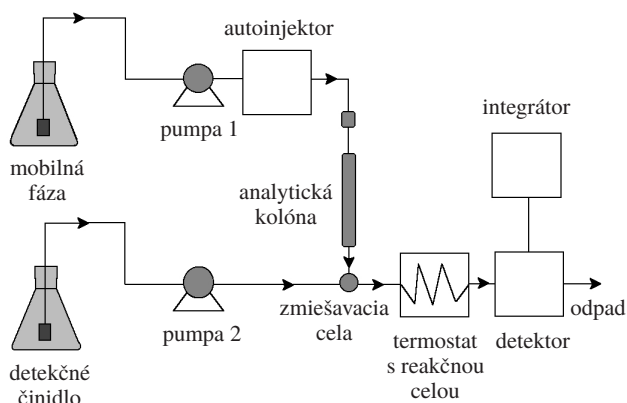
Hoci uvedené typy detekcie nenašli v súčasnosti širšie uplatnenie, predovšetkým kvôli ich nešpecifite a malej citlivosti, predstavujú jednoduchú alternatívu derivatizačných metód, predovšetkým pri analyzovaní vzoriek s vyšším obsahom PA.

5.1. HPLC s pokolónovou derivatizáciou

Pokolónová derivatizácia umožňuje zvýšenie citlivosti a špecifickosti detekcie analytov po ich separácii na analytickej kolóne. Oproti bežnej HPLC inštrumentácii si táto technika navyše vyžaduje samostatnú pumpu pre detekčné činidlo, zmiešavaciu komoru a temperovanú reakčnú celu (obr. 3).

Použitie pokolónovej derivatizácie pri stanovení salinomycínu HPLC v krmivách navrhli v roku 1984 Goras a Lacourse²³. Analyty separovali na silikagélovej kolóne s použitím zmesi etylacetátu, izooktánu, kyseliny octovej a trietylamínu (75:25:0,4:0,2) ako mobilnej fázy. Pokolónové derivatizačné činidlo pozostávalo z etanolového vanilínového roztoku s prídavkom kyseliny sírovej. V prezentovanej práci je veľký priestor venovaný optimalizácii pokolónovej detekcie z hľadiska pomeru prietoku mobilnej fázy a vanilínového reagentu ako aj z hľadiska teploty reakčnej cely. Je preukázané, že so zvyšujúcim sa prietokom reakčného činidla odozva salinomycínu stúpala, až dosiahla maximum pri pomere prietokov mobilnej fázy a reakčného činidla 2:1. Ďalším zvyšovaním prietoku odozva klesala. Tento jav je pripísaný nepriaznivým pomerom koncentrácií činidla a analytu pri nižších prietokoch a skrátením pobytu reagentov v reakčnej cele, a tým aj času potrebného na ukončenie reakcie pri vyšších prietokoch. Podobná závislosť bola popísaná aj pri sledovaní vplyvu teploty reakčnej cely, keď maximálna odozva salinomycínu bola pri $95\ ^\circ\text{C}$. Pri nižších teplotách bola farebná reakcia nedokonalá a pri vyšších dochádzalo k rozkladu farebného produktu a tiež k splynutiu reakčnej zmesi. Autori za uvedených podmienok dokázali za 15 minút separovať salinomycín od príbuzných látok 20-deoxysalinomycínu a 20-oxosalinomycínu a monenzínu pri limite detekcie $10\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Na túto prácu nadviazali o rok neskôr Blanchflower a spol.²⁴,



Obr. 3. Schéma HPLC prístroja s detekciou pokolónovou derivatizáciou

ktorí vo svojej práci využili pokolónovú detekciu pri HPLC stanovení monenzínu, narazínu a salinomycínu vo vzorkách krmív. Na rozdiel od predchádzajúcich autorov Blanchflower a spol. použili na separáciu analytov kolónu s reverznou fázou C18 a ako mobilnú fázu použili zmes metanolu, vody a kyseliny octovej (94:5,9:0,1). Sledované antibiotiká detegovali pri 520 nm. Pokolónová reakcia prebiehala pri $70\ ^\circ\text{C}$ počas 2 minút, trvanie reakcie ale vzhľadom na rozmyvanie píkovo v dlhej pokolónovej reakčnej cele neskôr znížili na 1,1 minúty. Vyššiu citlivosť stanovenia autori dosiahli zvýšením koncentrácie vanilínu na $100\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ oproti $30\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ použitým Gorasom a Lacoursom. Vyššiu citlivosť dosiahli aj použitím vyššej koncentrácie kyseliny sírovej v detekčnom činidle; na druhej strane táto koncentrácia (40 ml koncentrovanej H_2SO_4 na liter) rapídne znížila stabilitu reakčného činidla, preto sa autori vrátili k pôvodnej koncentrácii $20\ \text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$. Okrem optimalizácie detekčných podmienok sa Blanchflower a spol. zamerali na optimalizovanie podmienok prípravy vzorky (extrakcia PA zo vzoriek krmív). Antibiotiká boli v analyzovaných krmivách prítomné v koncentráciách $50\text{--}100\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Na ich extrakciu autori odskúšali nasledovné organické rozpúšťadlá: metanol, acetonitril, etanol, propanol, aceton a zmesi metanolu s vodou (50–90 % v/v). Najlepšie výsledky dosiahli použitím čistého a 90% roztoku metanolu, keď sa výťažky extrakcie uvedených analytov pohybovali v rozmedzí 98–100 %, resp. 96–100 %. Ako autori uvádzajú, danou metódou dosahovali spoľahlivé výsledky stanovenia PA v koncentračnom rozsahu $0,5\text{--}125\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Technika HPLC na reverzných fázach s pokolónovou derivatizáciou vanilínovým reagentom sa stala v 90. rokoch 20. storočia jednou z najpoužívanejších metód na stanovenie veterinárne používaných PA vo vzorkách produkčných fermentačných pôd^{25–27}, krmív a premixov^{24,28–31}. V prácach z tohto obdobia sú väčšinou uvedené optimalizácie separačných podmienok a podmienok pokolónovej reakcie z hľadiska aplikácie metódy na stanovované látky a druh vzorky. Podmienky použité pri analýze PA v jednotlivých publikovaných prácach sú zhrnuté v tabuľke II.

Metóda HPLC s pokolónovou derivatizáciou s vanilínom bola v roku 1997 na základe spoločnej práce desiatich laboratórií akceptovaná ako oficiálna metóda AOAC na stanovenie monenzínu v krmivách a premixoch krmných zmesí³². Pod-

Tabuľka II
Podmienky niektorých HPLC stanovení polyéterových antibiotík s pokolónovou derivatizáciou

Analyt ^a	Matrica	Príprava vzorky	Eluent; prietok	Analytická kolóna	Pokolónové činidlo; prietok	Podmienky ^b	Lit.
SAL	krmivo	extrakcia: etanol:propan-2-ol, 15:2; mikrovln. 2x8 s	acetonitril:voda:k. octová, 960:38:2; 0,5 ml.min ⁻¹	24,4x0,4 cm, Lichrospher 100 RP-18, 5 µm	DMABA ^c :H ₂ SO ₄ :metanol, 7,5:5:94,5 (w/v/v); 0,4 ml.min ⁻¹	85 °C; 10 mx0,5 mm; 592 nm	3
SAL	krmivo	extrakcia: hexán, mix. 2 h	etylacetát:izooktán:k. octová; trietylamín, 750:250:4:2; 0,54 ml.min ⁻¹	25x0,46 cm, Zorbax SIL	vanilín:H ₂ SO ₄ :etanol, 15:10:490 (w/v/v); 0,27 ml.min ⁻¹	95 °C; 7,5 mx0,25 mm; 527 nm	23
MON, NAR, SAL	krmivo	extrakcia: metanol, mix. 1 h	metanol:voda:k. octová, 940:59:1; 0,7 ml.min ⁻¹	25x0,46 cm, Partisil ODS-3, 5 µm	vanilín:H ₂ SO ₄ :metanol, 10:2:98 (w/v/v); 0,7 ml.min ⁻¹	70 °C; 7,6 mx0,5 mm; 520 nm	24
MON	fermentačná pôda	extrakcia: metanol	NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 3,0):metanol, 3:17; 1,5 ml.min ⁻¹	5x0,45 cm, Regis Little Champ ODS, 3 µm	vanilín:H ₂ SO ₄ :metanol, 3:3:100 (w/v/v); 1 ml.min ⁻¹	120 °C; 3,05 mx0,25 mm; 520 nm	26
MON	krmivo	extrakcia: metanol:voda, 9:1; mix. 1 h	metanol:voda:k. octová, 960:60:1; 0,7 ml.min ⁻¹	25x0,46 cm, Partisil ODS-3, 5 µm	vanilín:H ₂ SO ₄ :metanol, 3:2:95 (w/v/v); 0,7 ml.min ⁻¹	98 °C; 2 ml; 520 nm	28 (AOAC metóda)
MON, SAL, NAR	krmivo	extrakcia: hexán:etylacetát, 9:1; mix. 2 h	metanol:5% k. octová, 9:1; 0,5 ml.min ⁻¹	6x0,46 cm, C18 (HP)	vanilín:H ₂ SO ₄ :metanol, 2:10:490 (w/v/v); 1,0 ml.min ⁻¹	95 °C; 1,5 ml; 520 nm	29
MON	mlieko, tkanivo	extrakcia: metanol:voda; reextrakcia: dichlórmetán; SPE Si	metanol:voda:k. octová, 960:60:1; 0,7 ml.min ⁻¹	25x0,46 cm, Partisil ODS-3, 5 µm	vanilín:H ₂ SO ₄ :metanol, 3:2:95 (w/v/v); 0,7 ml.min ⁻¹	98 °C; 6,1 mx6,1 mm; 520 nm	35
MON, SAL, NAR	tkanivo	extrakcia: izooktán:etylacetát, 9:1, mix. 5 min; SPE Si	metanol:0,01 M octan amónny (pH 4,0), 94:6; 0,5 ml.min ⁻¹	25x0,32 cm, Inertsil ODS-3, 5 µm	vanilín:H ₂ SO ₄ :metanol, 9,5:2,5:125 (w/v/v); 0,3 ml.min ⁻¹	100 °C; 150x4,6 mm; náplň 75 µm sklen. guľičky; 520 nm	36
MON	tkanivo	extrakcia: 85% metanol; 5 min ultrazvuk; reextrakcia: dichlórmetán; SPE Si	methanol:voda:H ₃ PO ₄ , 940:60:1; 0,7 ml.min ⁻¹	30x0,39 cm, µBondapak TM, 5 µm C18	vanilín (30 mg.ml ⁻¹) v 2% H ₂ SO ₄ v metanole; 0,7 ml.min ⁻¹	90 °C; 3 mx1 mm; 520 nm	37
MON, NAR, SAL	–	–	metanol:0,1% k. octová, 94:6; 20 µl.min ⁻¹	55x0,1 cm, Separon C18, 5 µm	0,5 M-DMABA ^c v metanole; 0,75 M-H ₂ SO ₄ ; 5 µl.min ⁻¹	75 °C; 150x1 mm; náplň 40–70 µm sklen. guľičky; 592 nm	38

^a SAL – salinomycín, MON – monenzín, NAR – narazín, ^b teplota; reakčná celá, vlnová dĺžka, ^c DMABA – 4-(dimetylamino)benzaldehyd

mienky metódy AOAC pre stanovenie PA boli aplikované Rodewaldom a spol. aj pri stanovení narazínu v krmivách³⁰ a taktiež aj pri stanovení monenzínu v kuracích tkanivách³³. V tomto prípade bol zvolený iný postup prípravy vzorky, keď metanolový extrakt tkaniva bol ešte prečistený reextrakciou do tetrachlórmetánu s jeho následným prečistením na silikagélovej SPE kolónke pred analýzou HPLC.

Okrem stanovenia PA vo fermentačných pôdach a medicovaných krmivách našla metóda HPLC s pokolónovou derivatizáciou^{33–37} svoje uplatnenie aj pri stanovovaní reziduií PA v živočíšnych produktoch. Vzhľadom na nízku koncentráciu stanovovaného analytu v týchto vzorkách je veľmi dôležitým krokom úprava vzorky, ktorá zahŕňa zakoncentrovanie analytu a odstránenie možných interferujúcich zložiek. Pre tento účel sa používa viacnásobná kvapalinová extrakcia do rozpúšťadiel s rôznou polaritou³⁴, zakoncentrovanie a prečistenie extraktov na SPE kolónkach³⁶, alebo kombinácia oboch týchto techník^{33,35,37}. Gerhard a spol. prezentovali aplikáciu metódy HPLC na sledovanie reziduií monenzínu, salinomycínu, narazínu a lasalocidu v živočíšnych tkanivách³⁶. Separáciu antibiotík robili na kolóne s reverznou fázou C18, ako mobilnú fázu použili zmes metanolu a 0,01 M octanu amónneho (94:6). Na detekciu antibiotík aplikovali duálny detekčný systém, keď lasalocid detegovali priamo fluorescenčným detektorom (excitácia pri 300 nm, emisia pri 420 nm) a zvyšné antibiotiká detegovali pokolónovou derivatizáciou s vanilínom. Príprava vzorky spočívala v extrakcii analytov do zmesi izooktán–etylacetát a prečistení extraktu na silikagélových SPE kolónkach. Uvedeným spôsobom sa im v priebehu 16 min. podarilo detegovať lasalocid, salinomycín a narazín na úrovni 5 ng.g⁻¹ a monenzín 2 ng.g⁻¹.

Okrem vanilínu boli pre pokolónovú derivatizačnú reakciu testované aj iné benzaldehydové činidlá. Fejglóva a spol.³⁸ porovnávali pri stanovení monenzínu, narazínu a salinomycínu nasledovné detekčné činidlá: vanilín, 4-dimetylamino-benzaldehyd, 3,4-dimetoxybenzaldehyd a salicylaldehyd. Z týchto 4-dimetylamino-benzaldehyd v porovnaní s vanilínom poskytoval citlivejšiu reakciu so salinomycínom a narazínom. Praktické využitie 4-dimetylamino-benzaldehydu pri stanovení salinomycínu v krmných zmesiach³ a v kuracom mäse a vajciach popísali Akhtar a spol.³⁴ Na extrakciu antibiotika použili mikrovlnnú extrakčnú jednotku, čím sa im podarilo výrazne znížiť potrebný čas extrakcie (2×8 sekúnd), v porovnaní s klasickými spôsobmi (0,5–1 hod).

5.2. HPLC s predkolónovou derivatizáciou

Ďalším možným spôsobom zvýšenia citlivosti detekcie PA je príprava vhodných derivátov pred samotnou separáciou. V prípade polyéterových antibiotík bolo odskúšaných viacero reakcií na získanie derivátov aktívnych v UV oblasti, ako aj fluorescenčne aktívnych derivátov.

V roku 1986 Dimmena a spol. navrhli detekciu salinomycínu po oxidácii hydroxylovej skupiny na tetrahydropyránovom kruhu na ketoskupinu, ktorá v konjugácii so susednou nenasytenou väzbou dáva silnú absorbciu žiarenia pri 225 nm (cit.³⁹). Ako oxidačné činidlo použili dvojchroman pyridínia. Látky, ktoré pri stanovení interferovali, odstránili použitím techniky prepájania kolón (column-switching), samotnú separáciu robili na kolóne s reverznou fázou. Ako mobilnú fázu

použili zmes acetonitrilu, tetrahydrofuránu, vody a kyseliny fosforečnej (900:40:60:0,1). Dosiagnuté medze stanovenia salinomycínu vo vzorkách tkanív boli na úrovni 100 ng.g⁻¹. Metóda bola neskôr aplikovaná aj na stanovenie salinomycínu vo vzorkách ľudskej plazmy⁴⁰. V polovici 90. rokov popísal Mathur⁴¹ HPLC stanovenie salinomycínu v krmivách. Na zvýšenie citlivosti detekcie využil reakciu 2,4-dinitrofenylhydrazínu s voľnou karbonylovou skupinou salinomycínu v prostredí kyseliny chlórovodíkovej⁴¹. Produktom reakcie bol farebný hydrazón salinomycínu s absobčným maximom pri 419 nm, ktorý bol separovaný od činidla na kolóne s reverznou fázou C18. Modifikovaný postup bol použitý aj na stanovenie salinomycínu, narazínu a monenzínu v krmivách⁴².

Stanovenie veľmi nízkych koncentrácií (ng.g⁻¹) polyéterových antibiotík umožňuje použitie fluorescenčnej detekcie. V druhej polovici 80. rokov boli publikované práce, ktoré popisovali HPLC stanovenie fluorescenčne aktívnych derivátov PA pripravených pomocou 9-antryldiazometánu^{43–46}. Metóda bola použitá na stanovenie samotného monenzínu^{44–46}, alebo zmesi monenzínu, salinomycínu, narazínu a lasalocidu v živočíšnych vzorkách⁴³. V práci Martinéza a Shimodu je popísaná príprava derivátu lasalocidu priamou esterifikáciou s 9-antryldiazometánom a príprava derivátu monenzínu, salinomycínu a narazínu, ktoré najprv acylovali anhydridom kyseliny octovej a až potom esterifikovali 9-antryldiazometánom⁴³. Deriváty boli následne prečistené na silikagélovej kolóne, separované na analytickej kolóne s reverznou fázou C8 a detegované pri 418 nm (excitácia pri 365 nm). Stanovované koncentrácie uvedených analytov vo vzorkách tkanív sa pohybovali na úrovni 0,15 µg.g⁻¹.

Začiatkom 90. rokov bolo popísané japonskými autormi Asukabe a spol.⁴⁷ a Miyakawa a spol.⁴⁸ použitie 1-(brómocetyl)pyrénu pri príprave fluorescenčne aktívnych derivátov polyéterových antibiotík. Pripravené pyrénacyl estery salinomycínu a monenzínu boli po prečistení na SPE kolónke (Florasil) analyzované na analytickej kolóne s reverznou fázou C18 za použitia 94 obj.% metanolu ako mobilnej fázy. Deriváty detegovali pri 450 nm (excitácia pri 360 nm). Dosiagnutý limit detekcie salinomycínu a monenzínu vo vzorkách kuracieho mäsa⁴⁸ bol len 0,05 µg.g⁻¹.

Medzi hlavné nedostatky predkolónovej derivatizácie patrí hlavne prácnosť a čas spojený s prípravou a čistením derivátov, ako aj možnosť nereprodukovateľnosti derivatizácie stopových koncentrácií analytov. Možnou alternatívou stanovenia nízkych koncentrácií bez potreby derivatizácie je spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou detekciou.

5.3. HPLC s hmotnostnou detekciou

Spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou detekciou on-line spôsobom sa v posledných desiatich rokoch stalo široko používanou technikou na identifikáciu a stanovenie rôznych antibiotík⁴⁹. Tento rozvoj bol umožnený vývojom pomerne jednoduchých a robustných LC-MS rozhraní (interface) založených na ionizácii analytu pri atmosferickom tlaku, ktoré umožňujú aplikovanie LC-MS techniky v rôznych analytických oblastiach.

Svoje uplatnenie našla táto technika aj pri sledovaní stopových koncentrácií polyéterových antibiotík v živočíšnych produktoch^{50–51} a v krmivách^{52–54}. Medzi prvé práce popisujúce využitie LC-MS pri identifikácii monenzínu, salinomycínu,

narazínu⁵⁰ a lasalocidu⁵¹ v svalovine, pečeni a vajciach domácej hydiny patria publikácie Blanchflowera a Kennedyho z roku 1996, resp. 1995. V práci z roku 1996 sa popisuje príprava vzorky extrakciou analyzovaných látok do zmesi metanol–voda (13:2) pomocou ultrazvuku. Po prečistení analytov reextrakciou do zmesi hexán–toluén (2:1) boli tieto separované na kolóne s reverznou fázou s použitím mobilnej fázy pozostávajúcej z acetonitrilu, metanolu, tetrahydrofuránu, kyseliny trifluoroctovej a vody (67:10:10:0,1:13). Na monitorovanie a kvantifikáciu antibiotík autori použili ich [M+ Na] ióny, pripravené technikou elektrosprejovej ionizácie. Autori popisujú lineárnu závislosť stanovenia sledovaných antibiotík v oblasti 4–160 ng.g⁻¹, s detekčným limitom 0,5–1 ng.g⁻¹. O dva roky neskôr navrhli Volmer a Lock rýchle stanovenie (~4 min) salinomycínu, lasalocidu, monenzínu A, monenzínu B a narazínu A a narazínu I na krátkej kolóne s reverznou fázou (ODS 3 µm, 50×4 mm) (cit.⁵²). Na kompletnú separáciu všetkých zložiek použili ternárny gradient pozostávajúci z okyslenej vody (3% kyselina mravčia), acetonitrilu a metanolu. Polyéterové antibiotiká vo forme sodných komplexov fragmentovali elektrosprejovou ionizáciou, pričom použitím nízkoenergetickej kolízno-indukovanej disociácie (CID) získali väčší počet diagnostických iónov. Vyššiu špecifitu detekcie sa im podarilo dosiahnuť použitím tandemovej MS/MS techniky. Možnosti navrhnutej metódy autori demonštrovali pri stanovení salinomycínu vo vzorkách potravy pre mačky. K vzorke pridali koncentráciu salinomycínu 1 µg.g⁻¹, na extrakciu analytu aplikovali postup podľa Akhtara a Croteaua (mikrovlnová extrakcia)³ a použitím tandemovej MS detekcie dokázali selektívne stanoviť aj tieto nízke koncentrácie. Harris a spol. separovali salinomycín, monenzín, narazín a lasalocid na kolóne s reverznou fázou za cca 18 minút, keď ako mobilnú fázu použili zmes acetonitrilu, 20 mM octanu amonného a metanolu (3:1:1) (cit.⁵³). Pri elektrosprejovej kvadrupólovej MS detekcii analytov použili techniku kónicko-nápäťovo-riadenej fragmentácie, čím tiež vytvorili viacero diagnostických iónov, ktoré umožnili spoľahlivejšiu identifikáciu antibiotík.

Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou detekciou je vhodné na sledovanie reziduí polyéterových antibiotík vo vzorkách živočíšnych produktov a krmív. Na rozdiel od fluorescenčných metód, ktoré sa na tento účel taktiež používajú, príprava vzoriek pre hmotnostnú detekciu je jednoduchá, nevyžaduje si derivatizáciu a náročné čistiace kroky. Výhodou hmotnostnej detekcie je aj vyššia špecifickosť, ktorá umožňuje identifikáciu a potvrdenie prítomnosti antibiotika vo vzorke na základe jeho hmotnostného spektra.

6. Imunochemické metódy – ELISA

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) patrí medzi imunochemické metódy, ktoré sú založené na selektívnej, reverzibilnej a nekovalentnej väzbe medzi antigénom a protilátkou. V imunochemických metódach sa striedajú dva základné prístupy. Kompetitívny prístup využíva súťaž neznámeho množstva antigénu (napr. polyéterového antibiotika) so známym množstvom antigénu značeného enzýmom o väzobné miesta na protilátke viazanej v jamkách mikrotitračných platničiek⁵⁵. Nekompetitívny (tzv. sendvičový) prístup využí-

va väzbu stanovovaného antigénu na dve protilátky, z ktorých jedna je viazaná na pevnom nosiči (napr. stena mikrotitračnej platničky), a druhá protilátka značená enzýmom je naviazaná na antigén^{55–65}. Posledným krokom v oboch prípadoch je naviazanie substrátu, ktorý spôsobí merateľnú zmenu vlastností reakčného systému, napríklad zmenu absorbancie, chemiluminiscencie či fluorescencie.

Práce zaoberajúce sa štúdiom použitia metód pri stanovení polyéterových antibiotík boli väčšinou publikované v druhej polovici deväťdesiatych rokov, no prvé práce sa objavili už koncom 80. rokov. Autori v publikáciách z tohto obdobia popisujú stanovenie monenzínu^{55,59–61,63–64}, salinomycínu^{4,56–58} a lasalocidu⁶⁵ v biologických vzorkách, využívajúc v prevažnej miere nekompetitívny, sendvičový typ analýzy. Popisuje sa taktiež príprava polyklonálnych a monoklonálnych protilátok, ich značenie enzýmami, z ktorých najčastejšie sa vyskytuje chrenová peroxidáza^{4,57–60,63} a v menšej miere alkalická fosfatáza⁶⁴. Enzymatická aktivita sa stanovuje viacerými spôsobmi, z ktorých sa popisujú spektrofotometrické^{4,57–60,63,65} fluorescenčné^{56,62} a chemiluminiscenčné metódy⁶¹. Príprava vzorky v metódach ELISA spočíva v jej homogenizácii v biologických pufoch (napr. TRIS), pričom sa supernatant priamo analyzuje. Typickými analyzovanými maticami sú tkanivá hydiny a dobytky, krvná plazma a mlieko.

Koncentrácie PA stanovované vo vzorkách sa bežne pohybujú na úrovniach µg.g⁻¹ až ng.g⁻¹. Elissalde a spol.⁵⁸ vypracovali metódu ELISA, pri ktorej extrahovali salinomycín zo vzoriek pečene z hydiny do tmivého roztoku TRIS (pH 7,2), k extraktu pridali pripravenú protilátku a po hodinovej inkubácii reakčnú platničku premyli antiserom značeným peroxidázou. Po hodinovej inkubácii platňu premyli 0,5% roztokom tenzidu Tween 20 a enzymovú aktivitu stanovovali spektrofotometricky pomocou 2,2'-azinobis(3-etylbenziazolín-6-sulfónovou kyselinou). Stanovenie bolo citlivé na prítomný salinomycín v koncentracii 1,25–5 ng.g⁻¹ s návratnosťou 87 %. Okrem salinomycínu bola pripravená monoklonálna protilátka citlivá aj pre narazín o koncentracii 0,34–1,17 ng/jamku. Iný typ prípravy vzorky použili Crooks a spol.⁶⁰, keď monenzín vo vzorkách pečene hydiny extrahovali do acetonitrilu, extrakt zmiešali s 0,2 M-NaOH, a tento reextrahovali do zmesi hexán–dietyléter (1:1). Po odparení organickej zložky vzorku na analýzu pripravili rozpustením v zmesi etanolu a 100 mM octanu sodného (2:18). Stanovenie prebiehalo v mikroplatničkách, ktoré mali na steny naviazanú protilátku. Na platničky sa pridala stanovovaná vzorka a monenzín značený chrenovou peroxidázou a zmes sa inkubovala 90 min pri 37 °C. Enzymatická aktivita peroxidázy sa stanovovala spektrofotometricky pomocou tetrametylbendzínu. Pri stanovení autori popisujú lineárnu kalibračnú krivku v rozmedzí 1–50 ng.g⁻¹, s limitom detekcie 2,91 ng.g⁻¹. Crooks a spol.⁵⁵ využili metódu ELISA pri stanovení reziduí monenzínu v krvnej plazme dobytky; na stanovenie enzymatickej aktivity využili fluorescenciu, dosiahnutý limit detekcie a kvantifikácie bol 14 a 26 ng.ml⁻¹. Širšie použitie stanovenia polyéterových antibiotík metódou ELISA umožnilo uvedenie komerčnej súpravy určenej na sledovanie prítomnosti salinomycínu v krmivách a tkanivách⁶⁶ na trh v roku 1996 spoločnosťou ARS & Neogen Corp. Keďže metódy ELISA patria medzi najcitlivejšie metódy stanovenia PA, ich hlavné uplatnenie je pri stanovení stopových koncentracií PA v biologických a krmovínárskych maticiacich.

7. Záver

Vzhľadom na stúpajúci trend používania PA vo veterinárnej medicíne vznikla potreba ich sledovania v medikovaných krmivách a vo vzorkách biologických produktov. Tento cieľ je možné dosiahnuť viacerými analytickými postupmi, ktoré môžu byť založené na rozdielnych princípoch, z ktorých najvýznamnejšie sú stanovenia mikrobiologické, spektrofotometrické, imunochemické alebo separačné. Mikrobiologické stanovenia sú stále používané pri určení účinnosti antibiotika, ale postupom času sú nahrádzané časovo menej náročnými metódami. Techniky TLC a ELISA sú vhodné predovšetkým na účely zistenia prítomnosti a identifikácie PA. Technika kvapalinovej chromatografie sa presadila ako metóda pre potvrdenie prítomnosti analytu (confirmation) a v spojení s pokolónovou derivatizáciou benzaldehydovými činidlami sa v súčasnosti stala najpoužívanejšou metódou pri analýzach krmív, premixov a biologických produktov. Takisto rozvoj techniky LC-MS v posledných rokoch umožnil jej širšie použitie pri identifikácii a kvantifikácii PA na úrovniach $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

LITERATÚRA

- Berdy J., Aszalos A., Bostian M., McNitt K. L.: *CRC Handbook of Antibiotic Compounds*, zv. V. CRC Press, Boca Raton, Florida 1980.
- The American Board of Veterinary Toxicology (ABVT): <http://www.abvt.org/ionop.html>
- Akhtar H. M., Croteau L. G.: *Analyst* 121, 803 (1996).
- Watanabe H., Satake A., Kido Y., Tsuji A.: *Anal. Chim. Acta* 437, 31 (2001).
- Kline R. M., Stricker R. E., Coffman J. D., Bikin H., Rathmacher R. P.: *J. AOAC Int.* 53, 49 (1970).
- Kavanagh F. W., Willis M.: *J. AOAC Int.* 55, 114 (1972).
- Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky*, Čiastka 11, 1998.
- Golab T., Barton S. J., Scroggs R. E.: *J. AOAC Int.* 56, 171 (1973).
- Martinez E. E., Shimoda W.: *J. AOAC Int.* 66, 1506 (1983).
- Martinez E. E., Shimoda W.: *J. AOAC Int.* 67, 845 (1984).
- Karkocha I.: *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 34, 281 (1983).
- Karkocha I.: *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 35, 247 (1984).
- Karkocha I.: *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* 36, 310 (1985).
- Owles P. J.: *Analyst* 109, 1331 (1984).
- Asukabe H., Yoneyama H., Mori Y., Harada K.-I., Suzuki M.: *J. Chromatogr.* 396, 261 (1987).
- Blomkvist G. B., Jansson K. M., Ryhage E. R., Osterdahl, B.-G.: *J. Agric. Food Chem.* 34, 274 (1986).
- Landgraf W. W., Ross P. F.: *J. AOAC Int.* 81, 844 (1998).
- Gafner J. L.: *J. AOAC Int.* 82, 1 (1999).
- Schwaiger I., Horner H.: *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 79, 365 (1992).
- VanderKop P. A., MacNeil J. D.: *J. Chromatogr.* 508, 386 (1990).
- Dimenna G. P., Creegan J. A., Turnbull L. B., Wright G. J.: *J. AOAC Int.* 70, 504 (1987).
- Beran M., Zima J.: *Chromatographia* 35, 206 (1993).
- Goras J. T., Lacourse W. R.: *J. AOAC Int.* 67, 701 (1984).
- Blanchflower J. W., Rice D. R., Hamilton J. T. G.: *Analyst* 110, 1283 (1985).
- Sokolic M., Pokorny M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9, 1047 (1991).
- Neely F. L.: *J. Liq. Chromatogr.* 15, 1513 (1992).
- Neely F. L.: *Chromatographia* 31, 277 (1991).
- Bridges D. A., Roth D. M., Cleveland C. M., Moran J. W., Coleman M. R.: *J. AOAC Int.* 79, 1255 (1996).
- Lapointe M. R., Cohen H.: *J. AOAC Int.* 71, 480 (1988).
- Rodewald J. M., Moran J. W., Donoho A. L., Coleman M. R.: *J. AOAC Int.* 77, 821 (1994).
- Rodewald J. M., Moran J. W., Donoho A. L., Coleman M. R.: *J. AOAC Int.* 75, 272 (1992).
- Coleman M. R., Moran J. W., Mowrey D. H.: *J. AOAC Int.* 80, 693 (1997).
- Moran J. W., Rodewald J. M., Donoho A. L., Coleman M. R.: *J. AOAC Int.* 77, 885 (1994).
- Akhtar M. H., El-Sooud K. A., Shehata M. A. A.: *Food Addit. Contam.* 13, 897 (1996).
- Moran J. W., Turner J. M., Coleman M. R.: *J. AOAC Int.* 78, 668 (1995).
- Gerhardt G. C., Salisbury C. D. C., Campbell H. M.: *Food Addit. Contam.* 12, 731 (1995).
- Chen X. M., Shi X. X.: *Sepu* 17, 77 (1999); *Analytical WebBase* (ISSN 1471-7107); <http://www.rsc.org/CFAA/>
- Fejglova Z., Dolezal J., Hrdlicka A., Frgalova K.: *J. Liq. Chromatogr.* 17, 359 (1994).
- Dimenna G. P., Creegan J. A., Turnbull L. B., Wright G. J.: *J. Agric. Food Chem.* 34, 805 (1986).
- Karnes H. T., Wei A. T., Dimenna G. P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11, 823 (1993).
- Mathur A. K.: *J. Chromatogr.*, A 664, 284 (1994).
- Dusi G., Gamba V.: *J. Chromatogr.*, A 835, 243 (1999).
- Martinez E. E., Shimoda W.: *J. AOAC Int.* 69, 637 (1986).
- Martinez E. E., Shimoda W.: *J. AOAC Int.* 68, 1149 (1985).
- Hoshino Y., Horie M., Nose N., Iwasaki H.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 26, 585 (1985); *Analytical WebBase*, <http://www.rsc.org/CFAA/>
- Takatsuki K., Suzuki S., Ushizawa I.: *J. AOAC Int.* 69, 443 (1986).
- Asukade H., Murata H., Harada K.-I., Suzuki M., Oka H., Ikai Y.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 112 (1994).
- Miyakawa H., Horii S., Kokubo Y.: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 36, 725 (1995); *Chem. Abstr.* 124, 173755 (1996).
- Niessen W. M. A.: *J. Chromatogr.*, A 812, 53 (1998).
- Blanchflower J. W., Kennedy G. D.: *J. Chromatogr.*, B 675, 225 (1996).
- Blanchflower J. W., Kennedy G. D.: *Analyst* 120, 1129 (1995).
- Volmer D. A., Lock C. M.: *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 12, 157 (1998).
- Harris J. A., Russell C. A., Wilkins J. P.: *Analyst* 123, 2625 (1998).
- Hormazabal V., Yndestad M.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23, 1585 (2000).
- Crooks S. R. H., Fodey T. L., Gilmore G. R., Elliott C. T.: *Analyst* 123, 2493 (1998).

56. Kennedy G. D., Blanchflower J. W., O'Dornan B. C.: Food Addit. Contam. 12, 93 (1995).
57. Muldoon M. T., Elissalde M. H., Beier R. C., Stanker L. H.: J. Agric. Food Chem. 63, 1745 (1995).
58. Elissalde M. H., Beier R. C., Rowe L. D., Stanker L. H.: J. Agric. Food Chem. 41, 2167 (1993).
59. Watanabe H., Satake A., Matsumoto M., Kido Y., Tsuji A., Ito K., Maeda M.: Analyst 123, 2573 (1998).
60. Crooks S. R. H., Traynor I. M., Elliott C. T., McCaughey W. J.: Analyst 122, 161 (1997).
61. Godfrey M. A. J., Luckey M. F., Kwasowski P.: Food Addit. Contam. 14, 281 (1997).
62. Pauillac S., Halmos T., Labrousse H., Antonakis K., Avrameas S.: J. Immunol. Methods 164, 165 (1993).
63. Mount M. E., Failla D. L.: J. AOAC Int. 70, 201 (1987).
64. Heitzman R. J., Carter A. P., Cottingham J. D.: Br. Vet. J. 142, 516 (1986).
65. Kennedy D. G., Blanchflower W. J., O'Dornan B. C.: Food Addit. Contam. 12, 83 (1995).
66. Stanker L. H.: Agric. Res. 44, 23 (1996).

M. Blazsek (*Research and Development Section, Biotika Co., Slovenská Lupča, Slovak Republic*): **Review of Analytical Methods of Determination of Polyether Antibiotics**

A review is presented on the current state of analytical techniques used for determination of significant veterinary polyether antibiotics (salinomycin, narasin, monensin and lasalocid) in various matrices by spectrophotometric, microbiological, enzyme-immobilized immunosorbent and chromatographic methods. In particular high-performance liquid chromatography is discussed with special emphasis on various detection methods for these antibiotics.

POZVÁNKA

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

srdečně zve

na vědecko-pedagogické odpoledne

konané u příležitosti 50. výročí založení katedry

ve středu 28. května 2003 od 13 hodin

v posluchárně CH1 a v prostorách katedry biochemie PřF UK

Albertov 2030, Praha 2

Hosté vítáni

Potvrďte laskavě svoji účast:

Tel.: 22195 1284

e-mail: biochem@natur.cuni.cz