ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 49, No 4 (1998)

Determination of tylosin residues in animal tissues by HPLCPDA.

A. D. TSIGOURI (Α.Δ. ΤΣΙΓΟΥΡΗ), A. E. TYRPENOU (Α.Ε. ΤΥΡΠΕΝΟΥ), E. H. GOUTA (Ε.Η. ΓΟΥΤΑ)

doi: 10.12681/jhvms.15783

Copyright © 2018, AD TSIGOURI, AE TYRPENOU, EH GOUTA

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

TSIGOURI (Α.Δ. ΤΣΙΓΟΥΡΗ) A. D., TYRPENOU (Α.Ε. ΤΥΡΠΕΝΟΥ) A. E., & GOUTA (Ε.Η. ΓΟΥΤΑ) E. H. (2018). Determination of tylosin residues in animal tissues by HPLCPDA. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *49*(4), 294–299. https://doi.org/10.12681/jhvms.15783

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 30/12/2025 02:46:16

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1998, 49(4): 294-299

Προσδιορισμός καταλοίπων τυλοσίνης σε μυς και νεφρούς με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Α.Δ. Τσιγουρή[1], Α.Ε. Τυρπένου[1], Ε.Η. Γούτα[2]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η τυλοσίνη (αντιβιοτικό που ανήκει στα μακρολίδια) χρησιμοποιείται ευρέως, και θεραπευτικώς, αλλά και ως προσθετικό ζωοτροφών για την αύξηση των αποδόσεων των παραγωγικών ζώων. Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια καταλοίπων τυλοσίνης στους μυς, το ήπαρ και τους νεφρούς βοοειδών, χοίρων και πτηνών είναι 100 μg/kg [Κανονισμός (ΕΟΚ) 1442/95]. Για τον προσδιορισμό των καταλοίπων τυλοσίνης στους μυς και τους νεφρούς εφαρμόσθηκε, με μικρές τροποποιήσεις, η μέθοδος των Chan και συν. (1994), η οποία αποδείχθηκε ότι είναι απλή, γρήγορη και ακριβής. Η εκχύλιση του δείγματος γίνεται με ακετονιτρίλιο και φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 2,5) και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος με εκχύλιση στερεάς φάσης σε μικροστήλη BondElut C18. Η τυλοσίνη εκλούεται με 0,1M διάλυμα οξικού αμμωνίου σε μεθανόλη. Ο προσδιορισμός επιτυγχάνεται με RP-HPLC και UV ανίχνευση στα 287 nm. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται σε στήλη Symmetry C18 (150 x 3,9 mm, 5μ) και με κινητή φάση το μίγμα: 0,1M διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου (pH 5,0) / ακετονιτρίλιο (70/30) σε ροή 0,8 ml/min. Τα δείγματα επιβεβαιώνονται εύκολα με σύγκριση των φασμάτων των ύποπτων κορυφών με το φάσμα της κορυφής της πρότυπης ουσίας. Η ανάκτηση της μεθόδου είναι 86,70±0,95%, για δείγματα επιβαρυμένα με 40-500 μg/kg και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού είναι 40 μg/kg.

Λέξεις ευρετηρίασης: κατάλοιπα, τυλοσίνη, μακρολίδια, αντιβιοτικά, υγροχρωματογραφία.

[1] *Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Αθηνών - Ι.Κ.Ε.Α. Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας-ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.*

[2] *Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς (Τμήμα Ελέγχου Καταλοίπων) Ινστιτούτο Υγιεινής Τροφίμων, Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Αθηνών, Υπουργείο Γεωργίας*

[1] *Institute of Veterinary Research of Athens - I.V.R.A. National Agricultural Research Foundation - N.Ag. Re. F.*

[2] *European Union National Reference Laboratory (Residue Analysis Laboratory) Institute of Food Hygiene, Centre of Athens Veterinary Institutions, Ministry of Agriculture*

Ημερομηνία υποβολής: 19.02.98
Ημερομηνία εγκρίσεως: 08.07.98

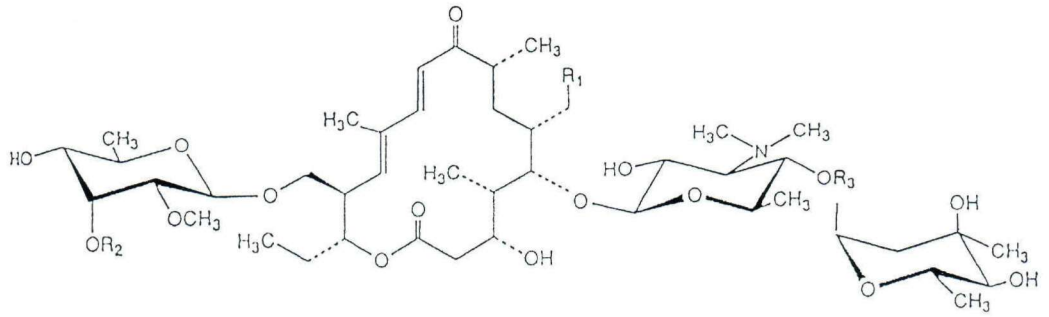
ABSTRACT. Tsigouri A.D., Tyrpenou A.E., Gouto E.H. Determination of tylosin residues in animal tissues by HPLC-PDA. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1998, 49(4):294-299.* **Tylosin belongs to the group of macrolide antibiotics and is widely used both therapeutically against Gram-positive microorganisms and *Mycoplasma spp.* and as a feed additive for growth promotion. In the European Union, according to Regulation 1442/95, tylosin residues of up to 100 μg/kg are permitted in the edible tissues of slaughter animals. For the determination of tylosin residues in meat and kidney samples a modification of the method of Chan et al. (1994) has been applied. The method is simple, rapid and accurate. Tylosin extraction is carried out with acetonitrile combined with phosphate buffer (pH 2.5) and extract eleanup is performed using BondElut C18 s.p. cartridges. Tylosin is luted with 0.1M ammonium acetate in methanol. The determination is accomplished by RP-HPLC with UV detection at 287 nm. The LC separation is carried out on a Symmetry C18 column (150x3.9 mm, 5μ) using a mobile phase of 0.1M ammonium formate (pH 5.0) / acetonitrile (70/30) at a flow rate of 0.8 ml/min. Positive results are easily confirmed by spectra comparison. The recovery achieved was 86.70±0.95% and the limit of determination 40 μg/kg. Diluted standards and sample extracts are stable for 3 weeks if kept at -20°C.**

Key words: residues, tylosin, macrolides, antibiotics, liquid chromatography.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τυλοσίνη, αντιβιοτικό που ανήκει στα μακρολίδια, έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κυρίως κατά των μυκοπλασμάτων. Το αντιμικροβιακό της φάσμα όμως επεκτείνεται και στους μικροοργανισμούς: *Streptococcus, Bacillus, Clostridium, Staphylococcus, Vibrio, Erysipelothrix, Spirochaetes, Fusiformis, Pasteurella* και *Chlamydia*. Χορηγείται ευρέως σε μηρυκαστικά, χοίρους και πτηνά, τόσο θεραπευτικώς όσο και για προληπτικούς λόγους[1].

Η ευρωπαϊκή ένωση έχει θεσπίσει τα 100 μg τυλοσίνης ανά kg ιστού ως ανώτατο επιτρεπτό όριο καταλοίπων της ουσίας στους μυς, το ήπαρ και τους νεφρούς των βοοει-



	R_1	R_2	R_3
Τυλοσίνη A	-CHO	$-CH_3$	-μυκαροσυλ
Τυλοσίνη B (Δεσμυκοσίνη)	-CHO	$-CH_3$	-H
Τυλοσίνη C (Μακροκίνη)	-CHO	-H	-μυκαροσυλ
Τυλοσίνη D (Ρελομυκίνη)	$-CH_2OH$	$-CH_3$	-μυκαροσυλ

Εικόνα 1. Χημική δομή των τυλοσινών

δών, χοίρων και πτηνών[2]. Στις ΗΠΑ και τον Καναδά αντίστοιχο όριο αποτελούν τα 200 μg/kg ιστού[3]. Αντίθετα, στην Ιαπωνία υπάρχει μηδενική ανοχή στα αντιβιοτικά για όλα τα τρόφιμα[4]. Σύμφωνα με το εθνικό πρόγραμμα ελέγχου καταλοίπων της χώρας μας, ορισμένο ποσοστό των κατ' έτος σφαζόμενων ζώων ελέγχεται ως προς την παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών στους μυς και τους νεφρούς με τη μικροβιολογική μέθοδο των 4 τρυβλίων (FPT)[5]. Δείγματα που εμφανίζουν ζώνη ανάσχεσης ≥2 mm στα τρυβλία με τον *Micrococcus luteus* ATCC 9341 pH 8.0 θεωρούνται ύποπτα για μακρολίδια, των οποίων η παρουσία και η συγκέντρωση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με χημική μέθοδο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η τυποποίηση μιας αξιόπιστης υγροχρωματογραφικής μεθόδου κατάλληλης για τον ποσοτικό προσδιορισμό καταλοίπων τυλοσίνης στους μυς και τους νεφρούς.

Η τυλοσίνη είναι προϊόν ζυμώσεως στελεχών στρεπτομυκήτων. Αποτελείται από ένα 16μελή κυκλικό δακτύλιο λακτόνης (μακρολίδιο), όπου ενώνονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς η αμινογλυκοσίδη μυκαμινόζη και τα ουδέτερα σάκχαρα μυκινόζη και μυκαρόζη. Κατά τη ζύμωση, εκτός από το κύριο προϊόν, την τυλοσίνη A (TA), παράγονται και οι ουσίες: τυλοσίνη B ή δεσμυκοσίνη (TB), τυλοσίνη C ή μακροκίνη (TC), τυλοσίνη D ή ρελομυκίνη (TD) και δεμυκινοσυλτυλοσίνη (DMT), η χημική δομή των οποίων φαίνεται στην εικόνα 1. Έχει όμως βρεθεί[6] ότι η τυλοσίνη A αντιπροσωπεύει το 80-90% του συνόλου τυλοσίνης που υπάρχει στα εμπορικά σκευάσματα. Επί πλέον, μολονότι η τυλοσίνη μεταβολίζεται, κανείς από τους μεταβολίτες δεν βρίσκεται στους ιστούς σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από ό,τι η αρχική ουσία[7]. Ως εκ τούτου, ο έλεγχος καταλοίπων του αντιβιοτικού είναι δυνατόν να γίνει με τον έλεγχο της κύριας ουσίας, της τυλοσίνης A[8]. Σχετικώς με την κατανομή της στους ιστούς είναι γνωστόν, ότι τα μακρολίδια εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις στους ιστούς που έχουν pH χαμηλότερο από αυτό του πλάσματος. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των μακρολιδίων είναι η εμφάνιση υψηλών συγκεντρώσεων στους πνεύμονες[4]. Ειδικότερα για την τυλοσίνη ο ιστός - στόχος εξαρτάται από τη μέθοδο χορήγησης. Όταν χορηγείται παρεντερικά, οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στους νεφρούς. Αντιθέτως, όταν χορηγείται από το στόμα, το ήπαρ περιέχει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις[9].

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό καταλοίπων αντιβιοτικών στους ιστούς η τεχνική επιλογής είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Για τον προσδιορισμό της τυλοσίνης ανιχνευτής επιλογής είναι ο φασματοφωτομετρικός, καθόσον η ουσία εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στο υπεριώδες και κατ' αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η ευαισθησία της ανίχνευσης. Στο εργαστήριό μας εφαρμόσαμε τη μέθοδο των Chan και συν.[8] με μικρές τροποποιήσεις.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν (νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, τριφθοροξικό οξύ) ήσαν υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για χρήση στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC grade) του οίκου Merck, και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (μυρμηκικό αμμώνιο, οξικό αμμώνιο, φωσφορικό κάλιο, φωσφορικό οξύ) ήσαν του ίδιου οίκου, αλλά αναλυτικής καθαρότητας. Ως πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε ταρταρική τυλοσίνη (Sigma). Παρασκευαζόταν μητρικό διάλυμα τυλοσίνης (1000 μg/ml) σε μεθανόλη και από αυτό παρασκευάζονταν διαλύματα ερ-

5g ομοιογενοποιημένου ιστού
+10 ml CH_3CN
↓
Υδατόλουτρο υπερήχων x10 min
Φυγοκέντρηση 2000 rpm x 5 min
Παραλαβή υπερκειμένου
↓
Επανάληψη εκχύλισης με:
5 ml CH_3CN + 5 ml 0,1 M KH_2PO_4 (pH 2,5)
↓
Διήθηση εκχυλισμάτων και προσθήκη 80 ml DW
↓
Εκχύλιση στερεάς φάσης C_{18} (500 mg Varian)
1. Ενεργοποίηση: 10 ml CH_3OH
10 ml DW
2. Δείγμα
3. Πλύσιμο με 20 ml DW
4. Στέγνωμα στήλης
5. Έκλουση: 2x750 μl 0,1 M CH_3COONH_4 σε CH_3OH
↓
Διήθηση (0,45 μm)
Εξάτμιση σε 100 μl
Συμπλήρωση σε 200 μl με CH_3OH
↓
5 μl έγχυση HPLC - PDA (287 nm)

Εικόνα 2. Σχηματική παράσταση της μεθόδου

γασίας συγκεντρώσεων 0,6, 1, 2, 5, 7, 10, 15 και 20 μg/ml ομοίως σε μεθανόλη. Τα διαλύματα εργασίας συντηρούμενα στους -20°C ήσαν σταθερά για 3 εβδομάδες.

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογράφος με φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή πολλαπλών φωτοδιόδων (Waters), συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (Waters), φυγόκεντρος, πεχάμετρο ακρίβειας 0,01, αναμίκτης (Vortex), μονάδα συμπύκνωσης με θερμαινόμενες υποδοχές και παροχή N_2 (Pierce), μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης BondElut C18 (500 mg, 6 ml, Varian), προστήλη C_8 Hypersil (30x4,6 mm, 5 μ), αναλυτική στήλη Symmetry C_{18} (150x3,9 mm, 5 μ, Waters), προφίλτρα γυάλινων μικροϊνιδίων πόρων 2 μm (Millipore AP20) και φίλτρα πόρων 0,45 μm (Millipore SJHVLO4NS).

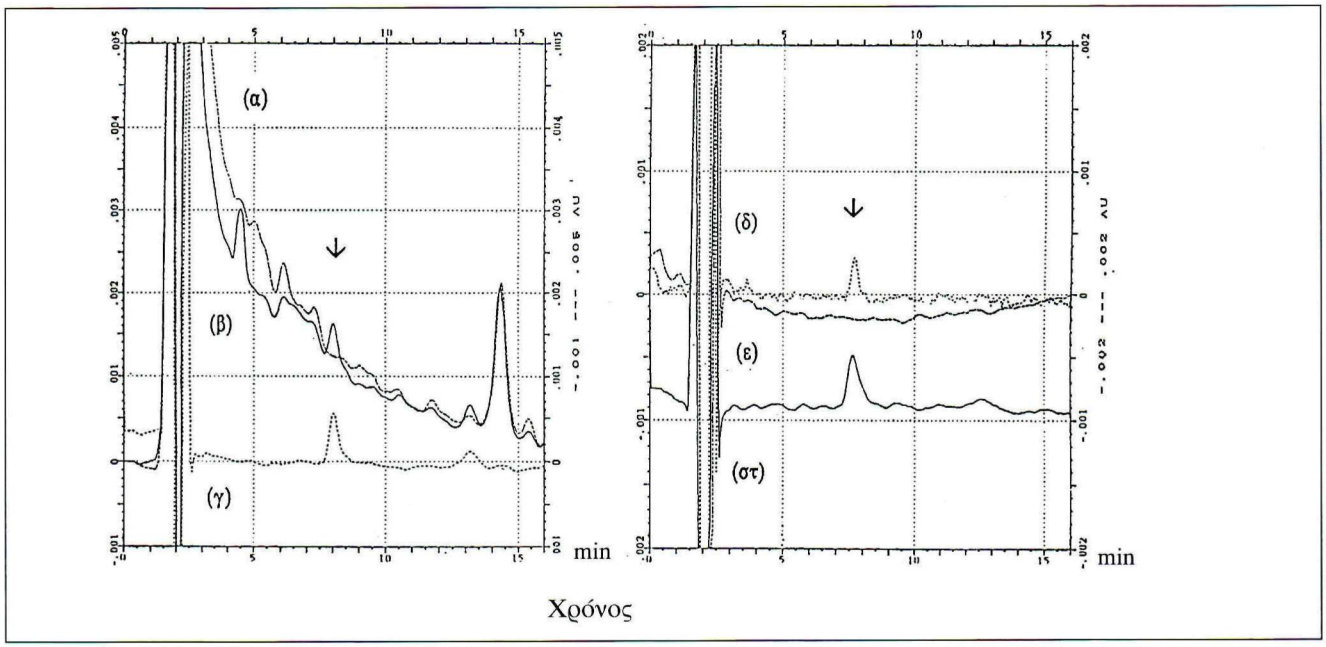
Μέθοδος

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 2. Τα δείγματα αποψύχονταν, τεμαχίζονταν και ομοιογενοποιούνταν. Ποσότητα 5 g ζυγιζόταν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες από πολυπροπυλένιο (χωρητικότητας 50 ml) και προσθέτονταν 10 ml ακετονιτριλίου. Οι σωλήνες πωματίζονταν, ανακινούνταν μηχανικά σε vortex για 5 λεπτά και παρέμεναν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 10 λεπτά. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση (900 g x 5 λεπτά) και το υπερκείμενο μεταφερόταν σε ποτήρι ζέσεως. Η δεύτερη εκχύλιση του δείγματος γινόταν με προσθήκη 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου (0,1 M, pH 2,5) και 5 ml ακετονιτριλίου. Οι σωλήνες ανακινούνταν εκ νέου μηχανικά, παρέμεναν σε υδατόλουτρο υπερήχων και φυγοκεντρούνταν. Το υπερκείμενο προσθετόταν στο πρώτο εκχύλισμα που υπήρχε στο ποτήρι ζέσεως και το σύνολο των εκχυλισμάτων διηθούνταν δια μέσου φίλτρου γυάλινων μικροϊνιδίων πόρων 2 μm. Ακολουθούσε εκχύλιση στερεάς φάσεως σε μικροστήλη BondElut C_{18}, η οποία είχε ενεργοποιηθεί με διαδοχικό πέρασμα 10 ml μεθανόλης και 10 ml νερού. Το δείγμα, στο οποίο είχαν προστεθεί 80 ml νερού για αύξηση της πολικότητας και υποβοήθηση της κατακράτησης της ουσίας στο C_{18}, περνούσε από τη στήλη με ροή 4 ml/min. Στη συνέχεια η στήλη πλενόταν με 20 ml νερού και στέγνωνε επί 10 λεπτά με άντληση αέρα σε αντλία κενού. Η έκλουση γινόταν με 2x750 μl διαλύματος οξικού αμμωνίου (0,1 M) σε μεθανόλη. Το έκλουσμα διηθούνταν δια μέσου φίλτρων με πόρους 0,45 μm και στέγνωνε στους 45°C με τη βοήθεια N_2 μέχρι τελικού όγκου περίπου 100 μl. Ο όγκος συμπληρωνόταν στα 200 μl με μεθανόλη και ποσότητα 5 μl εγχεόταν στον υγροχρωματογράφο. Τα προς χρωματογράφηση εκχυλίσματα είναι σταθερά για εβδομάδες συντηρούμενα στους -20°C.

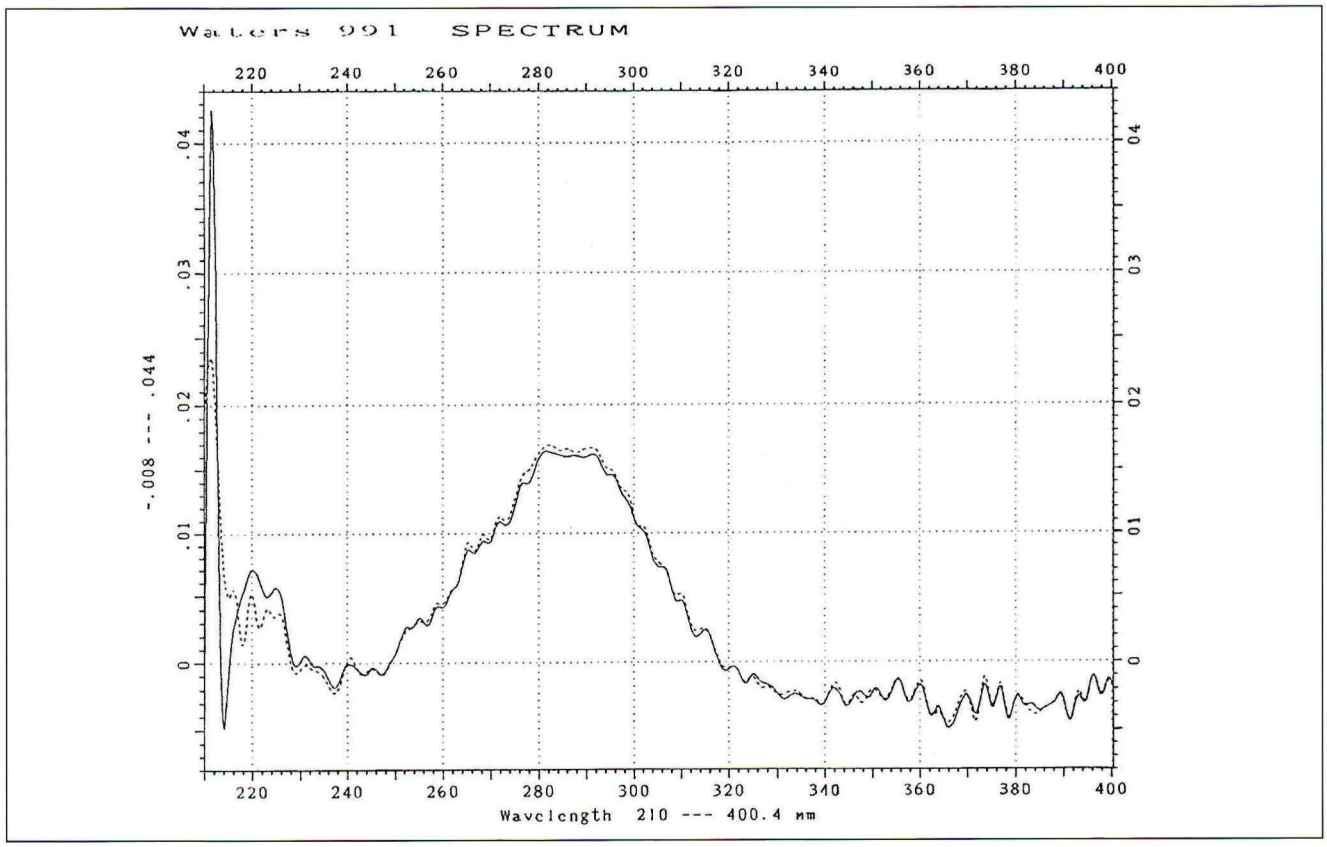
Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός γινόταν σε στήλη Symmetry C_{18} (150x3,9 mm, 5 μ) και με κινητή φάση το μίγμα: 0,1 M διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου (pH 5,0 ρυθμισμένο με τριφθοροξικό οξύ) / ακετονιτρίλιο (70/30), σε ροή 0,8 ml/min. Η ανίχνευση γινόταν στα 287 nm (εικόνα 3). Η επιβεβαίωση των ύποπτων κορυφών γινόταν με σύγκριση των φασμάτων τους με το φάσμα της πρότυπης ουσίας (εικόνα 4). Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχανόταν με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς. Για την κατασκευή της καμπύλης εγχέονταν και χρωματογραφούνταν διαδοχικά ποσότητες τυλοσίνης 3, 5, 15, 25, 35, 50, 75 και 100 ng σε όγκο έγχυσης 5 μl. Η σχέση των εμβαδών των κορυφών και των εγχεόμενων ποσοτήτων τυλοσίνης επιβεβαιώθηκε ότι ήταν γραμμική και εκφράζεται από την εξίσωση παλινδρόμησης $y = 0{,}0000131 + 0{,}0000216x$, όπου y παριστά το εμβαδόν της κορυφής σε AU*min και x την ποσότητα της ουσίας σε ng σε 5μl εγχεόμενου όγκου (εικόνα 5).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

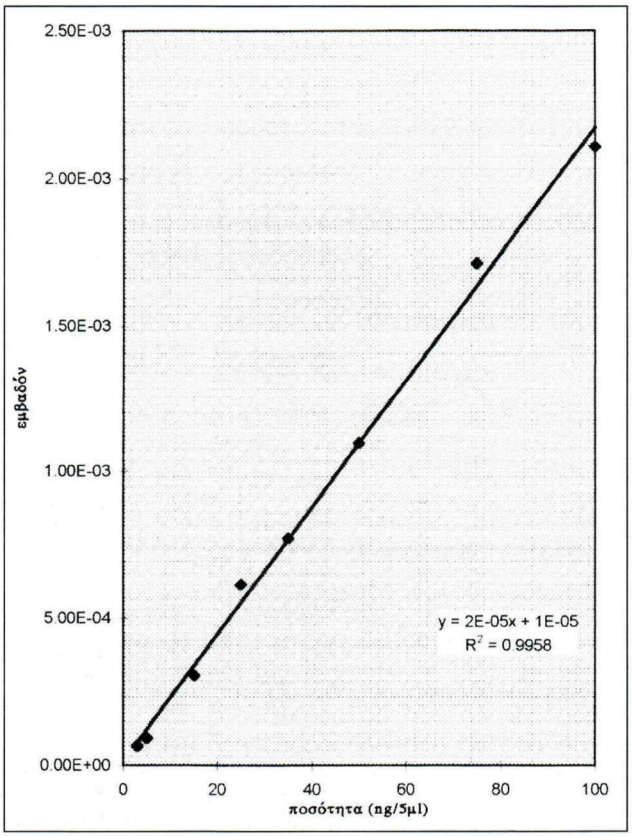
Η τυλοσίνη, όπως και τα άλλα μακρολίδια, είναι ασθενώς βασική και ισχυρώς λιπόφιλη ουσία. Η εκχύλισή της επιτυγχάνεται με οργανικό διαλύτη σε pH όπου η ουσία δεν είναι ιονισμένη. Διαπιστώθηκε ότι η τυλοσίνη εκχυλίζεται αρκετά καλά από τους μυς με ακετονιτρίλιο και μόνον, αλλά για την εκχύλισή της από τους νεφρούς απαιτείται χαμηλότερο pH. Με τη διπλή εκχύλιση με ακετονιτρίλιο και



Εικόνα 3. Χρωματογραφήματα (α) εκχυλίσματος νεφρού μη επιβαρυμένου, (β) εκχυλίσματος νεφρού επιβαρυμένου με 100 μg/kg (=12,5 ng/5 μl), (γ) & (στ) διαλύματος πρότυπης ουσίας (10 ng/5 μl), (δ) εκχυλίσματος μυών επιβαρυμένων με 50 μg/kg (= 6,25 ng/5 μl) και (ε) εκχυλίσματος μυών μη επιβαρημένων.



Εικόνα 4. Σύγκριση φάσματος ύποπτης κορυφής με το φάσμα της πρότυπης ουσίας. [---: φάσμα πρότυπης ουσίας (10 ng/5 μl), —: φάσμα κορυφής δείγματος μυών επιβαρυμένων με 50 μg/kg (=6,25 ng/5 μl)].



Εικόνα 5. Καμπύλη αναφοράς της τυλοσίνης

ακετονιτρίλιο / ρυθμιστικό διάλυμα (φωσφορικού καλίου pH 2,5) επιτυγχάνονται ικανοποιητικές ανακτήσεις και από τους μυς και από τους νεφρούς, χωρίς να επιβαρύνεται το εκχύλισμα με ανεπιθύμητες ουσίες. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η προσθήκη 80 ml νερού στο δείγμα πριν από την εκχύλισή του σε μικροστήλη C_{18} διότι συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη >15% εμποδίζουν την προσρόφηση της τυλοσίνης στο C_{18}. Το γεγονός αυτό, που αναφέρεται στη βιβλιογραφία[10], διαπιστώθηκε και στο εργαστήριό μας.

Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό δοκιμάστηκαν οι στήλες: Symmetry C18 (150x3,9 mm) 5 μ, Lichrocart C_8 (244x4 mm) 5 μ και μBondapak C18 (300x3,9) 10 μ με κινητή φάση μίγμα διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου και οργανικού διαλύτου. Οι δοκιμές στην κινητή φάση αφορούσαν στη μοριακότητα και το pH του διαλύματος του μυρμηκικού αμμωνίου, στην επιλογή του οργανικού διαλύτου, στην αναλογία του υδατικού διαλύματος και του διαλύτου, καθώς και στην ταχύτητα ροής. Οι καλύτερες συνθήκες (k′=3,56) επιτεύχθησαν με τη χρησιμοποίηση της στήλης Symmetry C_{18} και όταν κινητή φάση ήταν το μίγμα: 0,1 M διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου (pH 5,0 ρυθμισμένο με τριφθοροξικό οξύ) / ακετονιτρίλιο (70/30), με ροή 0,8 ml/min.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα υδατικά διαλύματα της τυλοσίνης θεωρούνται σταθερά σε pH 5,5 - 7,5, αλλά σε περισσότερο όξινες[4] ή αλκαλικές[11] συνθήκες παρατηρείται αποδόμηση της ουσίας. Η ήπια υδρόλυση της τυλοσίνης A έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τυλοσίνης B (η οποία παρουσιάζει φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της τυλοσίνης A) και του σακχάρου μυκαρόζη. Η περαιτέρω όξινη υδρόλυση οδηγεί στην παραγωγή δύο επιπλέον σακχάρων και μιας αδρανούς ουσίας[4]. Επειδή κατά την επεξεργασία του δείγματος σύμφωνα με τη μεθοδολογία μας η τυλοσίνη εκτίθεται σε όξινο περιβάλλον, είναι επιβεβλημένο αυτή η επεξεργασία να γίνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπροσθέτως, πρέπει να ελέγχεται ότι δεν αποδομείται η τυλοσίνη A προς τυλοσίνη B μέσα στη χρωματογραφική στήλη.

Για τον υπολογισμό της ακρίβειας της μεθόδου 16 συνολικά δείγματα κρέατος και 16 ακόμη δείγματα νεφρού επιβαρύνθηκαν με τυλοσίνη σε 4 διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης και υποβλήθηκαν σε χημική ανάλυση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (ανάλυση της διακύμανσης προς δύο κατευθύνσεις με επανάληψη) διαπιστώθηκε ότι η ανάκτηση της μεθόδου δεν διέφερε σημα-

Πίνακας 1. Ανάκτηση της τυλοσίνης από δείγματα μυών και νεφρών

Είδος δείγματος	Επίπεδο συγκέντρωσης (μg/kg)	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση συγκέντρωση που βρέθηκε (μg/kg)	Τυπική απόκλιση	Σχετική τυπική απόκλιση (%)	Ποσοστό ανάκτησης (%)
Μύες	40	4	35,58	2,70	7,60	88,95
	100	4	88,14	3,89	4,41	88,14
	200	4	178,10	4,93	2,77	89,05
	500	4	435,58	23,69	5,44	87,12
Νεφροί	40	4	34,68	2,09	2,88	86,70
	100	4	87,30	4,60	5,27	87,30
	200	4	174,38	6,21	3,56	87,19
	500	4	431,92	18,62	4,31	86,38

ντικά ούτε μεταξύ των δειγμάτων κρέατος και των δειγμάτων νεφρού ($F = 0,80 < F_{πιν.} = 4,26$), ούτε μεταξύ των δειγμάτων που είχαν διαφορετική επιβάρυνση σε τυλοσίνη ($F = 0,14 < F_{πιν.} = 3,01$). Διαπιστώθηκε επίσης ότι υπάρχει γραμμικότητα της σχέσης μεταξύ των συγκεντρώσεων που βρέθηκαν (y) και των συγκεντρώσεων που πραγματικά υπήρχαν (x) στα δείγματα. Η σχέση αυτή αποδίδεται από την εξίσωση $y = 1,2608 + 0,8670x$ (με $r^2 = 0,996$ και συντελεστή α που δεν διαφέρει σημαντικά από το μηδέν). Η γραμμικότητα της σχέσης επέτρεψε την εκτίμηση της μέσης ανάκτησης από την κλίση της γραμμής παλινδρόμησης. Η ανάκτηση αυτή που εκφράζει και την ακρίβεια της μεθόδου ήταν 86,70 ± 0,95%. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου βρέθηκε ότι ήταν 40 μg/Kg υπολογιζόμενο σύμφωνα με το DFG[12].

Στα πλαίσια του Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου Καταλοίπων του 1995, παραλάβαμε ένα μόνο δείγμα κρέατος θετικό στη μικροβιολογική μέθοδο των 4 τρυβλίων για μακρολίδια. Το δείγμα αναλυόμενο με την υγροχρωματογραφική μέθοδο βρέθηκε αρνητικό για τυλοσίνη.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΟΦ. Κτηνιατρικό συνταγολόγιο, Πρώτο μέρος. Εκδόσεις Φαρμέτρικα, Αθήνα, 1995:47-51.
2. Ε.Ε. Κανονισμός 1442/95 σχετικά με την τροποποίηση των παραρτημάτων I, II, III και IV του κανονισμού (ΕΟΚ) 2377/90 του Συμβουλίου για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης. Εφημερίδα Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1995, L 143:26-30.
3. MacNeil JD, Ellis RL. Regulatory overview of antibiotic use in food - producing animals in north America and current methods of detection and analysis. In: Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. AOAC International, Arlington, 1995:1-29.
4. Horie M. Chemical analysis of macrolide antibiotics. In: Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. AOAC International, Arlington, 1995:165-205.
5. CNEVA Laboratoire des Medicaments Veterinaires, Document/ UCM 90/01/Rev.1
6. Roets E, Beirinckx P, Quintens I, Hoogmartens J. Quantitative analysis of tylosin by column liquid chromatography. J. Chromatogr. 1993, 630:159-166.
7. FAO Food and Nutrition Paper 41/4. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. 1991:109.
8. Chan W, Gerhardt GC, Salisbury CDC. Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed - phase liquid chromatography. Journal of AOAC International 1994, 77:331-333.
9. WHO Tech. Rep. Ser., 1991, No 815.
10. Petersen HW, Nielsen MB, Orntoft I, Rasmussen AS, Piechnic V. Method validation of a new HPLC method for the detection of spiramycin and tylosin in pigs muscle. In: Proceedings of the Euroresidue III conference. Veldhoven, 1996:791-794.
11. Keukens HJ, Tomassen MJH, Boekestein A. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of spiramycin and tylosin in milk. In: Proceedings of the Euroresidue III conference. Velbhoven, 1996:616-619.
12. Their HP and H. Zeumer (ed.) Manual of pesticide analysis. DFG, Deutsche Forschungsemeinschaft., VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1987, Vol. 1:37-45.