INSO
16929
1st. Edition
Dec.2013

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۶۹۲۹
چاپ اول
آذر ۱۳۹۲

شیر خام-اندازه‌گیری تتراسایکلین‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

Raw milk-Determination of tetracyclines by high performance liquid chromatography

ICS:67.100.01

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

(شیر خام- اندازه‌گیری تتراسایکلین‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا)

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
قاسم پور، علیرضا (دکترای شیمی تجزیه)	هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی
دبیر:	
غنوی، زهره (فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)	سازمان ملی استاندارد ایران-اداره کل نظارت بر اجرای استاندارد
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)	
ابوحسین، گیتی (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	آزمایشگاه های مرجع غذا و دارو
اسلامی، زهرا (دکترای فیتوشیمی)	دانشگاه شهید بهشتی–پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی
بهزاد، آیدا (فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)	عضو هیأت علمی دانشگاه پیام نور
توسلی، عبدالله (دکترای شیمی تجزیه)	سازمان دامپزشکی کشور
خلیلی، مهسا (فوق لیسانس شیمی تجزیه)	شرکت فن آوری های نوین دارویی آتیه
رضا زاده، سیاوش (فوق لیسانس محیط زیست)	اداره کل محیط زیست استان قزوین
رضوی سطونی، هاشم (فوق لیسانس صنایع غذایی)	شرکت بهاران گل

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

اعضاء:	سمت و/ یا نمایندگی
صنعی، آزاده (فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)	شرکت پارس طراوت خراسان
فرج اللهی، محمد مراد (دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی و بیولوژی مولکولی)	عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران
قبادی دانا، مریم (دکترای ژنتیک مولکولی)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد
غفاری، مریم (لیسانس صنایع غذایی)	شرکت پاکبان (سهامی خاص)
غنوی، زهرا (فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)	اداره کل محیط زیست استان قزوین
کاظمی، فرشته (لیسانس شیمی کاربردی)	شرکت پایش زیست مبنا
کرمی، روح الله (دکترای شیمی دارویی)	مرکز تحقیقات شیمی دارویی و گیاهی شیراز
محمودی میمندی، معصومه (فوق لیسانس سم شناسی)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد-گروه پژوهشی مواد غذایی
مصلح، نازنین (لیسانس مهندسی صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان البرز
مظاهری، منصوره (فوق لیسانس مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد-گروه پژوهشی مواد غذایی

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

اعضاء:	سمت و/ یا نمایندگی
مقدمی، شهپر (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشگاه استاندارد-گروه پژوهشی میکروبیولوژی
ملایی، سعید (دکترای فیتوشیمی)	دانشگاه شهید بهشتی- پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی
موسی خانی، فرهاد (دکترای میکروبیولوژی)	شرکت پایش زیست مبنا

فهرست مندرجات

عنوان		صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران		ج
کمیسیون فنی تدوین استاندارد		(د) و (ه) و (و)
پیش‌گفتار		ح
۱	هدف	۱
۲	دامنه کاربرد	۱
۳	مراجع الزامی	۱
۴	اصطلاحات وتعاریف	۱
۵	اساس روش	۳
۶	مواد و/یا واکنشگرها	۳
۷	وسایل	۸
۸	نمونه‌برداری	۹
۹	نگه داری نمونه پیش از آزمایش	۹
۱۰	روش اجرای آزمون	۱۰
۱۱	محاسبه نتایج	۱۴
۱۲	گزارش آزمون	۱۴

پیش‌گفتار

استاندارد "شیر خام - اندازه‌گیری تتراسایکلین‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا" که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده و در هزارو دویست و شصت و نهمین اجلاس کمیته ملی استاندارد مورخ ۱۳۹۲/۷/۲۰مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوّب بهمن ماه۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحوّلات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه‌ی صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۵: سال ۱۳۸۶، مقررات مربوط به ساختار و شیوه نگارش استانداردهای ملی ایران – (تجدیدنظر سوم).

2- AOAC: 2010,Multiple Tetracyclin Residues in MilkMetal Chelate Affinity-Liquid Chromatography Method-Chapter 33, P. 52.

شیر خام- اندازه‌گیری تتراسایکلین‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین مقدار تتراسایکلین‌های باقی مانده در شیر خام گاو به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، می باشد.

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد، برای اندازه‌گیری میزان تتراسایکلین‌ها در شیر خام گاو، کاربرد دارد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی الزاماتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن الزامات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مدارکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن موردنظر این استاندارد نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آن ها موردنظر است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱، آب- مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه – ویژگی ها و روش های آزمون(تجدید نظر اول).

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۵۶۵۸: سال ۱۳۸۰، روش نمونه‌برداری شیر برای کنترل باقی مانده داروئی.

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می‌رود:

۴-۱

شیرخام[1]

شیرخام مایعی است مترشحه حاصل از دوشش کامل پستان دام سالم حداقل چهار روز پس از زایمان که با اصول صحیح، تغذیه و نگهداری شده باشد و در شرایط بهداشتی (مطابق با استاندارد ملی ایران ۵۵۶۱ : سال

1- Raw milk

۱۳۷۹) دوشیده شده و تحت هیچ شرایطی آب یا ماده دیگری به آن اضافه و یا از آن کسر نگردیده باشد، همچنین شیر خام باید فاقد آغوز[1] باشد و هیچ گونه عملیات فرآوری روی آن انجام نشده باشد.

یادآوری ۱–شیرخام را بلافاصله پس از دوشش خنک نموده و در شرایط مناسب تا ۴ درجه سلسیوس سرد شود.

یادآوری ۲–شیر خام باید با دمای کمتر از ۸ درجه سلسیوس تحویل گرفته شود و یخ زده نباشد.

۴-۲

حد تعیین مقدار

کم‌ترین غلظت از تتراسایکلین در نمونه است، که با صحت و دقت قابل قبول، اندازه‌گیری می‌شود و مفهوم ریاضی آن برابر با ده برابر انحراف معیار، تقسیم بر شیب منحنی کالیبراسیون، می‌باشد.

۴-۳

استخراج[2]

به جداسازی تتراسایکلین‌ها از نمونه مورد آزمون، با استفاده از ستون کوچک، گفته می‌شود.

۴-۴

نمونه شاهد[3]

به نمونه شیر خام گاو، که بدون تتراسایکلین‌ها باشد، گفته می‌شود.

۴-۵

صحت[4]

به نزدیکی یا توافق بین نتیجه آزمون با میزان واقعی آن که در نمونه وجود دارد، گفته می‌شود.

۴-۶

دقت[5]

به نزدیکی بین نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های مستقل بر روی یک نمونه یکنواخت، که در شرایط معیّن و مشخص انجام شده باشد، گفته می‌شود.

یادآوری – دو تعریف نوشته شده به شرح زیر در بندهای ۴-۷ و ۴-۸ این استاندارد برای تعیین دقت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

1-Colostrum
2- Extraction
3- Blank
4- Accuracy
5- Precision

۷-۴

تکرارپذیری[1]

به نزدیکی بین نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های مکّرر بر روی یک نمونه، در یک آزمایشگاه، و با استفاده از یک روش آزمون، در شرایط مشابه، از نظر آزمایش کننده و دستگاه مورد استفاده، با فاصله زمانی کوتاه، تکرارپذیری گفته می‌شود.

۸-۴

تجدید پذیری[2]

به نزدیکی بین نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های مکّرر بر روی یک نمونه، که با استفاده از یک روش آزمون، در شرایط مختلف، توسط افراد متفاوت آزمایش‌کننده، دستگاه و آزمایشگاه متفاوت از آزمایشگاه اول انجام شده باشد، تجدیدپذیری گفته می‌شود.

۹-۴

نمونه کنترل مثبت

به نمونه‌ای از شیر، که به آن مقدار معیّن و مشخصی از استانداردهای تتراسایکلین، به صورت دستی اضافه شده باشد، گفته می‌شود.

۱۰-۴

نمونه کنترل منفی

به نمونه‌ای از شیر، که عاری از تتراسایکلین باشد، گفته می‌شود.

۵ اساس روش

تتراسایکلین‌های موجود در نمونه شیرخام گاو، به وسیله سانتریفوژ و به کمک بافر سدیم سوکسینات، استخراج شده و سپس، از ستون کوچک حاوی رزین‌های کی لیت فلزی، عبور داده می‌شود. ستون کوچک، شسته شده و تتراسایکلین‌های متصل به ستون به وسیله بافر McIlvaine-EDTA-NaCl، شویش[3] می‌شود. سپس، محلول حاصل فیلتر شده و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تزریق می‌شود.

1- Repeatability
2- Reproducibility
3- Elution

۶ مواد و/یا واکنشگرها

در طی مراحل اندازه‌گیری، در مواردی که درجه خلوص مواد و یا معرف ها اعلام نشده است، می‌توان تنها از مواد با خلوص تجزیه‌ای آزمایشگاهی[1] یا بالاتر، بهره گرفت.

۶-۱ استانداردهای تتراسایکلین

استاندارد اکسی تتراسایکلین[2]، و نمک‌های هیدروکلرید دمکلوسایکلین[3]، تتراسایکلین[4]، مینوسایکلین[5]، دوکسی سایکلین[6]، متاسایکلین[7] و کلروتتراسایکلین[8]، استفاده شوند.

یادآوری- استانداردهای تتراسایکلین با درجه خلوص بالا، استفاده شوند. برای مثال: ۹۹٪، در صورتی که از ملح با درجه خلوص پایین‌تر استفاده شود، این موضوع باید در محاسبه موردنظر قرار گیرد.

۶-۲ اگزالیک اسید دو آبه، با درجه خلوص مناسب کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۶-۳ دی سدیم هیدروژن فسفات بدون آب

۶-۴ دی سدیم اتیلن دی آمین تترااستیک اسید[9]دو آبه

۶-۵ سدیم کلرید

۶-۶ سیتریک اسید یک آبه

۶-۷ سوکسینیک اسید

۶-۸ سدیم هیدروکسید

یادآوری – جامد سدیم هیدروکسید به سرعت رطوبت هوا را جذب می‌کند و بنابراین، در ظرف باید به‌طور محکم بسته شود و در جای خشک و بیرون از یخچال، نگه‌داری شود.

۶-۹ سولفات مس ۵ آبه

۶-۱۰ اتانول، با درجه خلوص مناسب کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۶-۱۱ متانول، با درجه خلوص مناسب کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۶-۱۲ استونیتریل، با درجه خلوص مناسب کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

1- Analytical grade
2- Oxytetracycline
3- Demeclocycline
4- Tetracycline
5- Minocycline
6- Doxycycline
7- Methacycline
8- Chlortetracycline
9- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

۶-۱۳ آب مقطر دیونیزه شده، با درجه خلوص مناسب کروماتوگرافی (بهتر است که از آب مخصوص کروماتوگرافی که تحت تابش فرابنفش قرار گرفته باشد، استفاده شود).

۶-۱۴ رزین های کی لیت فلزی[۱]

یادآوری– ایمینو دی استیک اسید با تشکیل محیط سوسپانسیونی در اتانول ۲۰٪ با اپوکسی، پیوند کوالانسی تشکیل می دهد و بنابراین، باید در یخچال نگه‌داری شود.

۶-۱۵ بافر McIlvaine-EDTA-NaCl.

۱۲/۹ گرم از سیتریک اسید یک آبه (طبق بند ۶-۶) و ۱۰/۹ گرم از دی سدیم هیدروژن فسفات بدون آب (طبق بند ۶-۳) را در یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری، حل کرده و به‌وسیله آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، آن را به حجم برسانید و محلول را در یخچال، نگه داری کنید.

۳۷/۲ گرم از نمک دی سدیم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید دو آبه (طبق بند ۶-۴) و ۲۹/۲ گرم از نمک سدیم کلرید (طبق بند ۶-۵) را به یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری، منتقل کنید و سپس، با استفاده از بافر McIlvaine، آن را به حجم برسانید و محلول را از فیلتر نایلونی ۰/۲ میکرومتر، عبور دهید.

یادآوری ۱- محلول نهایی در دمای اتاق در مدت کم‌تر از دو هفته، پایداری دارد.

یادآوری ۲- در این آزمون، منظور از بافر McIlvaine-EDTA-NaCl، همان محلول فیلتر شده آن است.

۶-۱۶ محلول ۱۰ مولار سود سوزآور

۲۰/۰ گرم از سدیم هیدروکسید (طبق بند ۶-۸) را به بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری، منتقل کنید و با آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، آن را به حجم برسانید و این محلول را در دمای اتاق، نگه داری کنید.

یادآوری– در صورتی که جامد سدیم هیدروکسید رطوبت جذب کرده باشد، مولاریته محلول نهایی کم‌تر از مقدار محاسبه شده، به دست می‌آید و حجم مصرفی محلول ۱۰ میلی مولار سود سوزآور در تیتراسیون، افزایش می‌یابد.

۶-۱۷ بافر ۰/۱ مولار سدیم سوکسینات با pH=۴/۰

۱۱/۸ گرم از سوکسینیک اسید (طبق بند ۶-۷) را به یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری، منتقل کنید و در مقدار کم‌تر از یک لیتر آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، آن را حل کنید و با محلول ۱۰ مولار سود سوزآور (طبق بند۶-۱۶) pH آن را روی ۴/۰، تنظیم کنید و نهایتاً حجم آن را با آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، به یک لیتر برسانید و محلول را در یخچال، نگه داری کنید.

یادآوری–پس از گذشت مدت یک‌ماه و یا در صورت مشاهده ذرّات خارجی در محلول، از مصرف آن خودداری کنید.

۱- این رزین به شکل تجارتی در بازار قابل تهیه است.

۶-۱۸ محلول ۱۰ میلی مولار سولفات مس

۰/۵ گرم از سولفات مس ۵ آبه (طبق بند ۶-۹) را در مقداری آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، حل کنید و حجم نهایی آنرا به ۲۰۰ میلی لیتر برسانید. این محلول را در ۲۵ درجه سیلسیوس، نگه داری کنید

۶-۱۹ محلول ۲۰٪ حجمی-حجمی اتانول

۲۰۰ میلی لیتر از اتانول (طبق بند ۶-۱۰) را به بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری، منتقل کنید و با آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، آن را به حجم برسانید و در یخچال، نگه داری کنید.

یادآوری– این محلول، در دمای اتاق نسبتاً فرّار است و بنابراین، در ظرف را باید به‌طور محکم ببندید.

۶-۲۰ فاز متحرک[1]

۶-۲۰-۱ حلال A:

۶-۲۰-۱-۱ محلول ۱۰ میلی مولار اگزالیک اسید

۱/۲۶ گرم از اگزالیک اسید ۲ آبه (طبق بند ۶-۲) را به بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری، منتقل کنید و با آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳)، آن را به حجم برسانید.

یادآوری – این محلول، به مدت یک ماه پایدار[2] است.

۶-۲۰-۱-۲ حلال B:

۶-۲۰-۱-۲-۱ متانول (طبق بند ۶-۱۱)

۶-۲۰-۱-۲-۲ آب مقطر(طبق بند ۶-۱۳)

۶-۲۰-۱-۲-۳ استونیتریل (طبق بند ۶-۱۲)

یادآوری ۱- همه حلال ها باید از فیلتر نایلونی با منافذ ۰/۲ میکرون، عبور داده شوند.

یادآوری ۲-اگر از سیستم پمپ‌های دوتایی استفاده می‌شود، حلال B ممکن است از استونیتریل:متانول به نسبت ۸:۲۲، تا محلول ۱۰ میلی مولار اگزالیک اسید:استونیتریل:متانول به نسبت‌های ۸:۲۲:۷۰، استفاده شود تا سیستم مناسب در حالت شرح داده شده در بند ۱۰-۴-۲،حاصل گردد.

1- Mobile phase

۲-منظور این است که در مدت یک ماه تغییر ساختار و غلظت ندارد.

۶-۲۰-۲ محلول‌های استاندارد

یادآوری ۱- تمام محلول‌های استاندارد، زمان انقضای آن‌ها مدت ۳ ماه پس از تهیه محلول ذخیره اولیه می‌باشد و باید در دمای پایین تر از ۱۰ درجه سلسیوس، نگه داری شوند.

یادآوری ۲- ظروف شیشه‌ای آزمایشگاهی را با کلریدریک اسید یک نرمال، شستشو دهید و به وسیله آب‌مقطر و پس از آن به‌وسیله متانول، آب‌کشی کنید. شستشو به وسیله کلریدریک اسید یک نرمال، از دید احتیاط، به دلیل جلوگیری از آلودگی جانبی با تتراسایکلین‌ها، می‌باشد.

۶-۲۰-۲-۱ محلول ذخیره اولیه

۱۰ میلی گرم از هر یک از استانداردهای نامبرده شده (طبق بند ۶-۱) را به طور جداگانه در یک ظرف مخصوص، وزن کرده و به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری تیره رنگ جدا، منتقل کنید و سپس، در متانول (طبق بند۶-۱۱)، آن را حل کرده و به حجم برسانید و این مخلوط را به خوبی تکان دهید تا انحلال کامل انجام گیرد. غلظت محلول های به دست آمده ppm ۱۰۰است.
(در صورت نیاز چند قطره آب مقطر در ابتدابرای حل شدن نمونه افزوده شود).

یادآوری – این محلول ها به مدت ۲ ماه در دمای ۱۰ درجه سلسیوس،پایدار هستند.

۶-۲۰-۲-۲ محلول ذخیره ثانویه

۰/۵ میلی لیتر از هر محلول ذخیره اولیه (طبق بند ۶-۱۵) را با پی پت، به دقت بردارید و به یک بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری تیره رنگ، منتقل کنید و با متانول (طبق بند ۶-۱۱)، آن را به حجم برسانید و آن را خوب مخلوط کنید. غلظت محلول به دست آمده ppm ۱است.

یادآوری – این محلول، در کم‌تر از مدت ۵ روز در دمای ۱۰ درجه سلسیوس،پایدار است.

۶-۲۰-۲-۳ محلول‌های استاندارد کروماتوگرافی برای تهیه منحنی کالیبراسیون[1]

یادآوری –این محلول‌ها، به دلیل عدم پایداری آن‌ها باید به شکل روزانه تهیه شوند.

۶-۲۰-۲-۳-۱ غلظت ۱۵۰ppb

۰/۷۵ میلی لیتر از محلول استاندارد ثانویه تتراسایکلین‌ها را به یک بالن ۵ میلی لیتری، منتقل کنید و با استفاده از بافر McIlvain-EDTA-NaCl (طبق بند ۶-۲۰-۱)، آن را به حجم نهایی برسانید، غلظت این محلول نسبت به هر یک از استانداردهای تتراسایکلین برابر باppb ۱۵۰است.

1- Calibration curve

۶-۲۰-۲-۳-۲ غلظت ۱۰۰ppb

۴ میلی لیتر از محلول ۱۵۰ppb را به ظرف مناسبی (مانند: بالن ژوژه یا ویال)، منتقل کرده و به آن ۲ میلی لیتر بافر McIlvain-EDTA-NaCl (طبق ۶-۲۰-۱)، اضافه کنید.

۶-۲۰-۲-۳-۳ غلظت ۵۰ppb

۲ میلی لیتر از محلول ۱۰۰ppb را به ظرف مناسبی(مانند: بالن ژوژه یا ویال)، منتقل کرده و به آن ۲ میلی لیتر بافر McIlvain-EDTA-NaCl (طبق بند ۶-۱۵)، اضافه کنید.

۶-۲۰-۲-۳-۴ غلظت ۲۰ppb

۱ میلی لیتر از محلول ۱۵۰ppb را به ظرف مناسبی(مانند: بالن ژوژه یا ویال)، منتقل کرده و به آن ۴ میلی لیتر بافر McIlvain-EDTA-NaCl (طبق بند ۶-۱۵)، اضافه کنید.

یادآوری–محلول‌هایppb ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰استانداردهای کروماتوگرافی به ترتیب با غلظت هایppb ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ ، در نمونه شیر رقیق نشده معادل هستند.

۶-۲۰-۳ آماده سازی محلول های کنترل

برای تهیه نمونه‌های کنترل باید از نمونه شیر کامل استفاده کرد.

۶-۲۰-۳-۱ نمونه کنترل منفی: از شیری استفاده کنید که عاری از تتراسایکلین باشد.

۶-۲۰-۳-۲ نمونه کنترل مثبت: برای تهیه این نمونه، مقادیر ۱۵، ۳۰ و ۶۰ نانوگرم تتراسایکلین بر میلی‌لیتر، اضافه کنید به این منظور، باید به ترتیب ۷۵، ۱۵۰ و۳۰۰ میکرولیتر از محلول ذخیره ثانویه به ۵ میلی‌لیتر از شیر کنترل، اضافه شود.

۷ وسایل

علاوه بر تجهیزات معمولی آزمایشگاه، شامل: بشر، قیف، بالن، ارلن، وسایل دیگر مورد نیاز به شرح زیر می‌باشد:

۷-۱ پمپ کروماتوگرافی مایع گرادیان، آشکارساز فرابنفش، با طول موج ۳۵۰nm

۷-۲ ستون کروماتوگرافی PLRP-SC۱۸endcap،۱۵۰ mm×۴/۶ mm، با اندازه ذره پنج میکرومتر

۷-۳ محافظ ستون، به طول ۲ cm، مناسب ستون (طبق بند ۷-۲) شامل مواد پرکننده یک‌سان

۷-۴ سیستم تزریق، با حجم ۲ میلی لیتر

یادآوری – اگر دستگاه بتواند با حجم های کمتری حساسیّت نشان دهد، می توانید از این حجم لوپ ها استفاده کنید.

۷-۵ ظروف شیشه‌ای، با حجم مناسب ۲ لیتری با در دارای واشر تفلونی

یادآوری– باید از ظروف شیشه ای آزمایشگاهی برای نگه داری حلال کروماتوگرافی مایع استفاده کرد.

۷-۶ فریزر، با محدوده سرمایی بین ۵۰- تا۸۰- درجه سلسیوس

۷-۷ تیوپ هایی با درپیچ‌دار از جنس پلی پروپیلن

۷-۸ ظروف توزین

۷-۹ بالن های حجمی ۵، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتری کلاس A

۷-۱۰ پی‌پت حباب‌دار پنج میلی لیتری

۷-۱۱ پی‌پت قابل تنظیم یک میلی لیتری

۷-۱۲ پی‌پت پاستوربه طول ۲۳ cm

۷-۱۳ هم‌زن[1] لوله آزمایش

۷-۱۴ یخچال آزمایشگاهی

۷-۱۵ پی‌پت اتوماتیک، با قابلیت اندازه گیری حجم های ۱۰-۲۰۰ میکرولیتر و ۱/۰۰-۰/۰۵ میلی لیتر

۷-۱۶ سیستم فیلتراسیون برای حلال HPLC، با ظرفیت های ۴، ۲، ۱ لیتر

۷-۱۷ صافی های سرسرنگی یک بار مصرف از جنس نایلون ۶۶، با اندازه منفذ به قطر ۰/۲ میکرومتر و قطر ۲۵ میلی متر

۷-۱۸ سانتریفوژ[2] یخچال‌دار، با قابلیت تنظیم در دمای ۱۰ درجه سلسیوس

۷-۱۹ ستون کوچک[3]، ۱۰ میلی لیتری یک بار مصرف از جنس پلی پروپیلن مجهز به فریت.

۷-۲۰ قفسه[4] برای نگه داشتن ستون کوچک (طبق بند ۷-۱۹).

۷-۲۱ اولترافیلترهای سانتریفوژی با ظرفیت ۲/۵ میلی لیتر برای حذف پروتئین هایی با وزن مولکولی بیش از ۳۰ هزار دالتون، بدون تغییر در غلظت تتراسایکلین‌ها (دقیقاً پیش از استفاده، اولترافیلترها را از طریق سانتریفوژ در ۱۵۰۰×g به مدت زمان ۱۵ دقیقه با ۲ میلی لیتر آب مقطر بشویید و سپس، آن را تکان دهید تا تمامی آب حذف شود).

1- Vortex mixer
2- Centrifuge
3- Mini column
4- Rack

۷-۲۲ لوله سانتریفوژ ۱۵ میلی لیتری با درب پیچی

۷-۲۳ فیلتر حلال HPLC، از جنس نایلون ۶۶ با منافذ به قطر ۰/۲ میکرون

۷-۲۴ ویال شیشه‌ای دستگاه نمونه‌گیری خودکار[1] با لوله‌های شیشه‌ای آزمایش

یادآوری ۱- ظروف اندازه‌گیری حجمی، باید دارای درجه A باشد، زیرا ظروف با این درجه حداقل خطای اندازه‌گیری را دارد.

یادآوری ۲- کلیه دستگاه‌های آزمایشگاهی که امکان کالیبراسیون آن ها وجود دارد، باید کالیبره باشند.

۸ نمونه‌برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۵۶۵۸: سال ۱۳۸۰، روش نمونه برداری شیر برای کنترل باقی مانده دارویی، انجام گیرد. نمونه دریافت شده باید نماینده واقعی محموله باشد.

۹ نگه‌داری نمونه پیش از آزمایش

شیر خام (تازه) را باید داخل یخچال، نگه‌داری کرده و آن را به سرعت، آزمایش کنید. در صورتی که امکان آزمایش سریع نمونه شیر میسر نباشد، آن را در ظروف پلاستیکی پلی پروپیلن، تقسیم نموده و در سرمای ۵۰- تا ۸۰- درجه سلسیوس، نگه داری کنید.

یادآوری – در زمان آزمایش، شیر یخ زده را در حمام نیم گرم آب با دمای حدود ۳۰ درجه سلسیوس، قرار دهید و آن را به آرامی ذوب کرده و مخلوط کنید.

۱۰ روش اجرای آزمون

۱۰-۱ آماده سازی ستون کوچک

بطری حاوی رزین‌های کی‌لیت فلزی(طبق بند ۶-۱۴)را با حرکت چرخشی، تکان دهید تا حالت سوسپانسیون تشکیل شود. سپس، با استفاده از پی پت اتوماتیک ۱ میلی لیتری(طبق بند ۷-۱۵)، ۰/۷ میلی لیتری از رزین-های کی‌لیت فلزی را به ستون کوچک، منتقل کنید. شیر انتهای ستون را باز کنید و اجازه بدهید بافری را که اضافه کرده‌اید، به شکل قطره‌ای از آن عبور کند. در صورت نیاز می توانید مقدار رزین‌ها را تغییر دهید. با

1-Auto injector

استفاده از ۲ میلی لیتر آب مقطر رزین‌ها را طی ۳ مرتبه، بشوئید و پس از آن ۲ میلی لیتر محلول سولفات مس (طبق بند۶-۱۸) را به آن، اضافه کنید. ستون را دوباره با ۲ میلی لیتر آب مقطر طی دو مرتبه، بشوئید.

یادآوری۱- یک سوم انتهای ستون باید به رنگ سفید باقی بماند و در اثر جذب ۰/۷ میلی لیتر Cu^{+2} آبی رنگ، حجم بستر باید بین ۱ تا ۱/۲ میلی لیتر باشد.

یادآوری ۲- ستون کوچک را می‌توان به شکل هم‌زمان در چند گروه تهیه کرد، به‌طوری که، ۱۰ تا ۱۴ محلول تست در مدت زمان ۸ ساعت، استخراج شوند.

۱۰-۲ استخراج تتراسایکلین‌ها از شیر

۵ میلی لیتر از نمونه شیر را به یک لوله آزمایش سانتریفیوژ یک بار مصرف، منتقل کنید و به مدت زمان ۱۵ دقیقه با سرعت g×۱۵۰۰در دمای۱۰درجه سلسیوس، سانتریفوژ کنید و بخش کرم رنگ را جدا کنید. سپس، لایه پایینی را با استفاده از پی‌پت پاستور (۲۳سانتی‌متری) به یک لوله سانتریفوژ دیگر، منتقل کنید.به این منظور، لایه چربی رویی را با پی‌پت پاستور، سوراخ کنید و شیر زیر آن را به لوله بعدی، منتقل کنید. لایه چربی را بیرون بریزید. ۱۰ میلی لیتر بافر سدیم سوکسینات به شیر بدون چربی، اضافه کنید، در لوله را ببندید، محتوای لوله را با چند مرتبه سر و ته کردن آن، به خوبی یکنواخت کنید و به مدت زمان۳۰ دقیقه با دور g×۱۵۰۰در دمای ۱۰ درجه سلسیوس، سانتریفوژ کنید. آن گاه، محلول رویی شفاف را مستقیماً از روی ستون، عبوردهید. اگر حجم مخزن کافی نبود، در دو مرحله اضافه کنید. اجازه دهیدکه محلول به خوبی از مسیر عبورکند، از پخش کردن بستر ستون، خودداری کنید. پس از این که دیگر هیچ مایعی بالای رزین دیده نشد، وارد مرحله بعدی شوید.

یادآوری ۱-ستون نباید خشک شود.

در این مرحله، ستون را به ترتیب با ۲ میلی لیتر بافر سدیم سوکسینات،۲میلی لیتر آب، سپس، ۲میلی لیتر متانول و۲ میلی لیتر آب مقطر بشویید.

یادآوری ۲-دو مرحله بعدی برای به دست آوردن بازدهی بالا اهمیت زیادی دارند.

به دقت ۰/۷±۰/۰۵ میلی لیتر بافر McIlvaine-EDTA-NaCl(طبق بند۶-۱۵) وارد ستون کوچک نمایید. بافر را از دیواره‌های ستون، قطره قطره بدون پخش شدن بستر ستون در آن بریزید. محلول عبور کرده را دور بریزید. با افزودن ۲/۵±۰/۰۵ میلی لیتر بافر McIlvaine-EDTA-NaCl تتراسایکلین ها را از ستون، شویش دهید. محلول شویش شده را که باید آبی رنگ باشد، در یک لوله آزمایش جمع کنید و آن را تا زمان آنالیز در یخچال نگه‌دارید و یا آن را به طور مستقیم در حفره بالایی فیلترهای سانتریفیوژی، جمع‌آوری کنید. فیلتراسیون را مطابق بند ۱۰-۳، انجام دهید.

یادآوری۳-ستون باید دراین مرحله به‌رنگ سفید باشد.

با افزودن ۲-۳ میلی لیتر بافر McIlvaine-EDTA-NaCl ستون را تمیز کنید. ستون را طی ۳ مرتبه با ۲ میلی لیتر آب مقطر و پس از آن به‌وسیله ۵-۱۰ میلی لیتر اتانول، بشویید. ستون را با مقدار اضافی از اتانول ٪۲۰، پرکنید، در آن را ببندید و آن را در یخچال نگه‌دارید.

یادآوری ۱-پیش از این که در نوبت بعدی از ستون استفاده کنید، باید ستون را چند مرتبه به خوبی سر و ته کنید تا مجدداً حالت سوسپانسیونی، تشکیل شود.

یادآوری ۲- وقتی از ستون پس از مدتی دوباره استفاده می شود ، سر ستون را باز کنید و شیر انتهای ستون را باز کرده و اجازه دهید بافری که اضافه کرده اید به شکل قطره‌ای از آن عبورکند. در صورت نیاز می توانید مقدار رزین‌ها را تغییر دهید. با استفاده از ۲ میلی لیتر آب مقطر، رزین‌ها را طی۳ مرتبه، بشویید و ۲ میلی لیتر محلول سولفات مس به آن، اضافه کنید. ستون را دوباره با ۲ میلی لیتر آب مقطر طی دو مرتبه، بشویید. یک سوم انتهای ستون باید به رنگ سفید باقی بماند و در اثر جذب ۰/۷ میلی لیتر Cu^{2+} آبی رنگ، حجم بستر باید بین ۱ تا ۱/۲ میلی لیتر باشد.

یادآوری ۳- ستون‌هایی که به آن‌ها شیر فاسد و یا شیری با مقادیر زیاد تتراسایکلین (بیشتر از ۵ میکروگرم در میلی لیتر) افزوده شده باشد، قابل استفاده مجدد نیستند.

در صورتی که ستون ها در شرایط مناسب نگه‌داری شوند، حداقل برای مدت ۲ماه قابل نگه‌داری هستند.

۱۰-۳ اولترافیلتراسیون

محلول شویش حاوی تتراسایکلین ها حاصل از مرحله ی ۱۰-۲ را به اولترافیلتراسیون، منتقل کنید. محلول را به مدت زمان ۳۰ -۹۰دقیقه با سرعت۵۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ کنید. در واقع سانتریفیوژ را تا زمانی ادامه می دهیم تا بیش تر از ۱ میلی لیتر از محلول در فاز پایینی، جمع شود.

یادآوری۱- محلولی که در بند ۱۰-۲ جمع آوری کردید، ناپایدار است و به راحتی تشکیل رسوب می دهد و منجر به مسدود و تخریب شدن ستون دستگاه کروماتوگرافی می‌شود، بنابراین، محلول‌های نمونه را پیش از تزریق حتماً پروتئین زدایی کنید.

یادآوری۲- اگر نمونه جمع آوری شده در لوله آزمایش تا زمان آنالیز در یخچال نگه‌داری شده باشد و پیش از تزریق از فیلتر سر سرنگ عبور داده شود، این مرحله می تواند حذف شود.

۱۰-۴ کروماتوگرافی

حجم‌های مساوی از محلول‌های استاندارد کروماتوگرافی و محلول نمونه را که آماده کرده اید (طبق بند۱۰-۴-۱) به دستگاه کروماتوگرافی، تزریق کنید.

۱۰-۴-۱ شرایط سیستم کروماتوگرافی

۱۰-۴-۱-۱ فاز متحرک

برای تزریق محلول نمونه، ۱۰۰٪ از فاز A را با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه از ستون، عبور دهید. پس از گذشت مدت زمان ۱ دقیقه فاز متحرک را در طول مدت زمان ۵ دقیقه،با شیب ثابت به ترکیبی از حلال A-متانول-استونیتریل به نسبت۷۰:۸:۲۲ درصد، تغییر دهید. این شرایط به مدت زمان ۱۱ دقیقه با سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه برقرار است و پس از آن طی مدت زمان ۲ دقیقه با سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه با شیب ثابت به ۱۰۰٪ حلال A، باز گردید.

یادآوری۱-پیش از تزریق بعدی، به دستگاه فرصت کافی دهید تا با شرایط اولیه منطبق شود. در صورتی که هنگام استفاده از سیستم گرادیانی مشکلات عدم گاززدایی مناسب رخ داد و منجر به ظاهر شدن پیک‌های بزرگ شد و اندازه‌گیری با اشکال روبرو شد، افزایش مقادیر کمی از استونیتریل ۲-۵٪ به فاز A، و افزایش زمان بین تزریق‌ها، تا حدی به حل این مشکل کمک می کند. گاهی ممکن است لازم باشد تا محلول استاندارد ذخیره ثانویه را به جای متانول با آب مقطر تهیه کنید.

یادآوری ۲-توجه داشته باشیدکه، محلول آبی تتراسایکلین ها ناپایدار هستند و باید در همان روزاندازه‌گیری تهیه شوند.

یادآوری ۳- ستون کروماتوگرافی را باید در مخلوط آب و استونیتریل به نسبت یک به یک، نگه‌دارید. پیش و پس از هراستفاده از ستون (پایان کار عملی آن نوبت)، آب مقطر (طبق بند ۶-۱۳) را با سرعت جریان۱میلی لیتر بر دقیقه به مدت زمان۱۰-۱۵ دقیقه از ستون، عبور دهید.

۱۰-۴-۱-۲ آشکارساز UV

آشکارساز را در طول موج ۳۵۵ نانومتر، تنظیم کنید.

۱۰-۴-۱-۳ زمان اجرا[1]

زمان اجرا به مدت زمان ۲۰ دقیقه، تعیین می شود.

۱۰-۴-۱-۴ تزریق

از لوپی با حجم تزریق ۲ میلی لیتری، استفاده کنید. حجم تزریق می تواند متفاوت باشد و با توجه به حساسیت آشکار ساز می‌تواند بین ۱-۰/۵ میلی لیتر باشد. برای اندازه‌گیری صحیح باید حجم‌های مساوی به سیستم تزریق شود. بهتر است هر ۵-۱۰ تزریق یک بار، یک محلول استاندارد کروماتوگرافی تزریق شود و به این وسیله درستی زمان بازداری[2]، کنترل شود.

۱۰-۴-۱-۵ شناسایی پیک‌ها

ترتیب شویش تتراسایکلین‌ها به شکل زیر است:

مینوسایکلین، اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین، دمکلوسایکلین، کلروتتراسایکلین، متاسایکلین، دوکسی‌سایکلین.

1- Run time
2- Retention time

۱۰-۴-۱-۶ بررسی پایداری استخراج

تتراسایکلین‌ها در شرایط اسیدی در دمای اتاق پایدار نیستند (یعنی در بافر McIlvaine-EDTA-NaCl)، بیش از ۵۰٪ تتراسایکلین و کلروتتراسایکلین در مدت زمان ۲۴ ساعت، تخریب می‌شود. محصولات ناشی از تخریب در مقایسه با اصل ترکیب تمایل بیشتری به شسته شدن به وسیله فاز از خود نشان می‌دهند و اغلب با اکسی تتراسایکلین از ستون خارج می‌شوند. برای جلوگیری از بروز چنین مشکلی، باید کلیه مراحل سانتریفوژ در دمای ۱۰درجه سلسیوس انجام گیرد. نمونه ها حداکثر تا مدت زمان ۴ ساعت پس از آماده‌سازی، آنالیز شوند و یا حتماً در یخچال نگه‌داری شوند. محلول جمع‌آوری شده از ستون کوچک برای مدت کم‌تر از ۲ روز در یخچال و برای مدت کم‌تر از یک هفته در فریزر نگه‌داری شوند.

۱۰-۴-۲ آزمون‌های تشخیص کارکرد صحیح سیستم کروماتوگرافی

برای کنترل صحت سیستم برای هر سری از نمونه‌ها، باید محلول استاندارد کروماتوگرافی به دستگاه تزریق شود و به علاوه شرایط به شرح زیر نیز برقرار باشد:

۱۰-۴-۲-۱ وقتی در دستگاه تزریقی انجام نگرفته و یا وقتی فقط بافر تزریق می‌شود، در ناحیه حضور پیک‌های تتراسایکلین هیچ پیکی نباید ظاهرشود.

۱۰-۴-۲-۲ در صورت تزریق ۱۰ نانوگرم استاندارد کلروتتراسایکلین به ستون دستگاه پیک داشته باشیم.

۱۰-۴-۲-۳ هر هفت ترکیب مورد نظر در خط پایه یا نزدیک به خط پایه، از هم جدا شوند.جداسازی اکسی تتراسایکلین و تتراسایکلین باید بیش از ٪۹۰ و جداسازی متاسایکلین و دوکسی سایکلین باید بیش از ٪۷۰ باشد.

۱۰-۴-۲-۴ زمان بازداری ترکیبات مورد نظر در طول تزریق‌های مختلف، ثابت و تکرارپذیر باشد.

۱۰-۴-۲-۵ منحنی استاندارد باید درگستره مورد نظر به شکل خطی باشد.
گستره غلظتی که برای رسم منحنی استاندارد در نظرگرفته می‌شود، باید با مقادیر حقیقی مطابقت داشته باشد.

۱۰-۴-۲-۶ کنترل‌های منفی و مثبت را پیش از تزریق نمونه‌های اصلی و برای تنظیم روش به‌کار گرفته شده، انجام دهید.

۱۱ محاسبه نتایج

برای هریک از استانداردهای کروماتوگرافی، منحنی کالیبراسیون رسم کنید و غلظت ها را طبق معادله زیر محاسبه کنید:

معادله $P=mC+b$

که در آن:

P= سطح زیر پیک یا ارتفاع پیک مربوط به نمونه

m= شیب خط

C= غلظت تتراسایکلین نمونه تزریق شده به دستگاه، برحسب نانوگرم بر میلی لیتر

b= عرض از مبدأ

منحنی کالیبراسیون برای هر یک از تتراسایکلین‌ها باید خطی باشد.

برای اندازه‌گیری غلظت در نمونه شیر باید غلظت به دست آمده را به۲ تقسیم کنید (فاکتور رقیق‌سازی در ستون کوچک).

۱۲ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱-۱۲ همه آگاهی‌های لازم برای شناسایی نمونه

۲-۱۲ روش نمونه‌برداری

۳-۱۲ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۹۲۹: سال ۱۳۹۲، شیر خام- اندازه‌گیری تتراسایکلین‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۴-۱۲ هرگونه کارهای دیگری که دراین استاندارد نوشته نشده است و آزمایش‌گر آن را انجام داده است و هر آن چه که ممکن است روی نتیجه آزمون تأثیر داشته باشد.

۵-۱۲ نتایج آزمون به دست آمده

۶-۱۲ نتایج تکرارپذیری (اگر برّرسی شده است).

۷-۱۲ تاریخ انجام آزمون

۸-۱۲ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده

۹-۱۲ نام و نام خانوادگی و امضاء تأیید کننده