	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU HYDROXYANALOGU D, L-METHIONINU (HMTBA) METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení hydroxyanalogu D,L-methioninu (HMTBA) v krmivech.

Poznámky

1 *HMTBA je hydroxyanalogem esenciální aminokyseliny D,L-methioninu. Chemicky se jedná o kyselinu 2-hydroxy-4-(methylthio) máselnou. HMTBA se dodává jako 88%, vztaheno na obsah celkové kyseliny, ovšem prakticky jde o směs mono-, di-, tri- a oligomerů. Přípravou vzorku před nástřikem do HPLC se oligomery hydrolyzou kvantitativně převedou na monomer, jehož obsah se stanovuje.*

2 Princip

Obsah hydroxyanalogu D,L-methioninu (HMTBA) se stanoví po extrakci vzorku směsí voda-acetonitril a následné hydrolyze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s použitím UV detekce.

Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Methanol čistoty HPLC.

2 Acetonitril čistoty HPLC.

3 Hydroxid draselný, KOH, roztok, $c(\text{KOH}) = 500 \text{ g/l}$.


Příprava: V kádince o objemu 1000 ml se rozmíchá 500 g KOH ve vodě (6) a po vychladnutí se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

4 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , koncentrovaná, $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,69 \text{ g/ml}$.

5 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , roztok, $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,03 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s vodou (6) se přidá 2,047 ml kyseliny fosforečné (4), promíchá se a doplní vodou (6) po značku.

6 Voda destilovaná či deionisovaná, čistoty HPLC.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

- 7 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 500 \text{ g/l}$.
Příprava: V kádince o objemu 1000 ml se rozmíchá 500 g NaOH ve vodě (6) a po vychladnutí se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.
- 8 Extrakční směs: Acetonitril + voda, (10 + 90) (v/v).
Příprava: V 1000ml odměrné baňce se smíchá 100 ml acetonitrilu (2) a 900 ml vody (6). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.
- 9 Mobilní fáze.
Příprava: 90 obj. dílů roztoku kyseliny fosforečné (5) se smíchá s 10 obj. díly methanolu (1) a případně se upraví roztokem hydroxidu sodného (7) na hodnotu pH 2,5.
- 10 Hydroxyanalog D,L-methioninu (HMTBA), základní látka, např. 2-hydroxy-4-(methylthio)butyric acid calcium salt, CAS N. 4857-44-7.
- 11 Hydroxyanalog D,L-methioninu (HMTBA), základní standardní roztok.
Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží přibližně 15 mg hydroxyanalogu D,L-methioninu (10), doplní po značku extrakční směsi (8) a promíchá.
1 ml základního standardního roztoku obsahuje asi 0,05 mg HMTBA (podle navážky).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Lázeň ultrazvuková nebo třepačka laboratorní.
- 2 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím.
- 3 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.


5 Postup

5.1 Extrakce

Do 250ml kónické baňky se naváží pro premixy doplňkových látek 1 g a pro krmné směsi 10 g vzorku. Přidá se 100 ml extrakční směsi (8) a extrahuje se 10 min v ultrazvukové lázni nebo na mechanické třepačce (1). Potom se obsah baňky nechá sedimentovat a extrakt se filtruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, případně se naředí. K další hydrolyze se odpipetují 3 ml čirého supernatantu, přidá se 86 μl roztoku hydroxidu draselného (3) a protřepává se asi 10 s. Potom se přidá 86 μl kyseliny fosforečné (4) a znovu protřepe. Roztok se odstředí (2) při 8 000 ot/min po dobu asi 5 min nebo se přečistí přes membránový filtr 0,45 μm .

Poznámky

- 2 *Extrakt zkušební vzorku je třeba změřit co nejdříve, protože není stabilní ani při uchovávání v lednici.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

5.2 Kalibrace přístroje

5.2.1 Příprava kalibračního roztoku

Do sady 25ml odměrných baněk se postupně pipetuje (10; 15; 20) ml základního standardního roztoku HMTBA (11) a doplní po značku extrakční směsí (8). Koncentrace kalibračních roztoků je (20; 30; 40) µg HMTBA/ml. Jednotlivé standardy se musejí, stejně jako vzorek, hydrolyzovat. Do zkumavky se odpipetují 3 ml kalibračního roztoku HMTBA, přidá se 86 µl roztoku hydroxidu draselného (3) a protřepe. Potom se přidá 86 µl kyseliny fosforečné (4) a znovu protřepe. Takto připravené kalibrační roztoky se přečistí přes membránový filtr a potom se nastříkují na chromatografickou kolonu.

5.2.2 Stanovení metodou HPLC

Připravené kalibrační roztoky a extrakty vzorků se měří metodou RP-HPLC při vlnové délce 214 nm. Podmínky měření závisejí na použitém přístroji a je třeba ho optimalizovat v souladu s pokyny výrobce a pro měřenou matici.

Tabulka 1. Příklad podmínek měření.


Kolona	SymmetryShield™ RP ₈ , náplň 4µm, 150 mm × 3,9 mm nebo obdobná
Mobilní fáze	viz (9)
Teplota kolony	(20 – 25) °C
Průtok	0,8 ml/min
Detekce	UV, vlnová délka 214 nm
Nástřik	20 µl
Doba analýzy	(10 – 12) min. pro uvedené podmínky

Po ekvilibraci kolony přístroje HPLC (3) se nastříkuje kalibrační roztok i roztok zkoušeného vzorku dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků musejí být v toleranci nejvýše 2 % a bázi odezvy je plocha píku.

Z průměrných hodnot odezvy kalibračního roztoku a jeho koncentrace se sestrojí kalibrační křivka.

Poznámky

- 3 *Při zkoušení krmných směsí je nutno před každým dalším nástřikem zajistit, aby z kolony byly odstraněny složky, jejichž retenční časy jsou někdy dvoj- až trojnásobně vyšší než retenční čas monomeru hydroxyanalogu. Vyčistění kolony lze zajistit buď dostatečným časovým odstupem mezi jednotlivými nástřiky nebo propláchnutím kolony směsí acetonitril-voda (8).*

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	2
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

6 Výpočet a vyjádření výsledku

Koncentrace analytu v roztoku zkušební vzorku se vypočte z kalibrační rovnice. Tento výpočet provádí přímo vyhodnocovací program přístroje.

Obsah HMTBA, vyjádřený jako monomer hydroxyanalogu, v mg/kg (X) se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{C \times F \times V}{m}$$

kde

C je koncentrace monomeru zjištěná z kalibračního grafu $\mu\text{g/ml}$,

F faktor ředění,

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g,

V objem extraktu v ml.

Poznámky

- 4 *V případě požadavku na vyjádření výsledku stanovení jako suma methioninu a hydroxyanalogu methioninu se sečtou výsledky stanovení methioninu (podle JPP ÚKZÚZ, postup č. 10021.1) a hydroxyanalogu methioninu (podle JPP ÚKZÚZ, postup 10330.1).*

7 Literatura

VD LUFA: Methodenbuch III, Method 4.11.4, 3. Ed., 1993.