	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10340.1 – Stanovení obsahu maduramicinu a semduramicinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU MADURAMICINU A SEMDURAMICINU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení maduramicinu a semduramicinu v krmivech a premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Amonná sůl maduramicinu je monoglykosidní polyetherové ionoforové antibiotikum sumárního vzorce $C_{47}H_{83}NO_{17}$.

Semduramicin - chemický sumární vzorec: $C_{45}H_{75}O_{16}Na$.

2 Princip

Obsah maduramicinu a semduramicinu se stanoví po extrakci vzorku extrakční směsí, následném přečištění na pevné fázi a postkolonové derivatizaci metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Octan ethylnatý, $C_4H_8O_2$, čistota > 99,5 %.

2 Hexan, C_6H_{14} , čistota > 90 %.

3 Extrakční roztok pro krmné směsi.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 200 ml octanu ethylnatého (1), doplní n-hexanem (2) po značku a promíchá.

4 Dichlormethan, CH_2Cl_2 , čistota > 99,5 %.

5 Aceton, CH_3COCH_3 , čistota > 99,5 %.


6 Promývací roztok aceton-dichlormethan.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se odměří 10 ml acetonu (5) a doplní se po značku dichlormethanem (4) a promíchá.


7 Methanol, HPLC grade.

8 Eluční roztok – roztok methanolu v dichlormethanu.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 30 ml methanolu (7), doplní dichlormethanem (4) po značku a promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10340.1 – Stanovení obsahu maduramicinu a semduramicinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

- 9 Acetonitril, HPLC grade.
- 10 Tetrahydrofuran, HPLC grade.
- 11 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , $\rho = 1,71$ g/ml.
- 12 Mobilní fáze.
 Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 190,0 ml vody (21), přidá se 100,0 ml tetrahydrofuranu (10), 2,0 ml kyseliny fosforečné (11), doplní acetonitrilem (9) po značku a promíchá.
- 13 Acetonitril, vodný roztok.
 Příprava: V odměrné 500ml baňce se smíchá 350 ml acetonitrilu (9) a 150 ml vody (21) a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou po značku.
- 14 Extrakční roztok pro premixy.
 Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 200 ml vody (21), přidá se 700 ml methanolu (7) a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní methanolem (7) po značku a promíchá.
- 15 p-N,N'-dimethylaminobenzaldehyd (p-DMBA), $C_9H_{11}NO$, (pozor, je citlivý na světlo).
- 16 Kyselina sírová, H_2SO_4 , $\rho(H_2SO_4) = 1,83$ g/ml.
- 17 Derivatizační činidlo.
 Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 250 ml methanolu (7), opatrně se přidá 15,0 ml kyseliny sírové (16) (chlazení!) a v této směsi se rozpustí 15 g p-DMBA (15), ochladí se na laboratorní teplotu, doplní methanolem (7) po značku a promíchá. Směs se uchovává v chladu při teplotě do 10 °C a ve tmě. Je stabilní nejvýše 28 dní.
- 18 Maduramicin, sodná sůl, $C_{47}H_{79}O_{17}Na$, čistota 95,5 %.
- 19 Semduramicin, $C_{45}H_{75}O_{16}Na$, čistota 98 %.
- 20 Základní standardní roztoky.
Maduramicin
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží takové množství základní substance maduramicinu (18), aby výsledná koncentrace byla 200 mg/l. Rozpustí se v methanolu (7), doplní po značku a promíchá.
Semduramicin
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží takové množství základní substance semduramicinu (19), aby výsledná koncentrace byla 200 mg/l. Rozpustí se v methanolu (7), doplní po značku a promíchá.
- 21 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10340.1 – Stanovení obsahu maduramicinu a semduramicinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím a UV detekcí (dále jen přístroj HPLC).
- 2 Laboratorní třepačka horizontální.
- 3 Extrakční jednotka – SPE Manifold.
- 4 Koncentrátor vzorků.
- 5 Patronky Silica pro extrakci na pevné fázi (SPE) (např. Waters Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT 020520).
- 6 Zařízení pro postkolonovou deprivatizaci.
- 7 Ultrazvuková lázeň.
- 8 Laboratorní odstředivka.

5 Postup

Vzorek se homogenizuje a mele na částice o velikosti 0,5 až 1,0 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a mletí. Vzorek se upravuje těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám maduramicinu a semduramicinu. Roztoky maduramicinu a semduramicinu se musejí chránit před přímým slunečním světlem.


5.1 Extrakce

Do 250ml kónické baňky se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 0,5 mg semduramicinu nebo maduramicinu s přesností na 0,001 g. Obvykle se navažuje 0,5 g základní substance a trituru, 2 g až 10 g premixů doplňkových látek, 30 g krmných směsí (poznámka 1). K navážce základní látky nebo trituru se přidá 200 ml extrakčního roztoku (14), k navážce premixů doplňkových látek 100,0 ml extrakčního roztoku (14) a k navážce krmných směsí 100,0 ml extrakčního roztoku pro krmné směsi (3).

Baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce (2) 30 min. Poté se filtruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

Poznámky

- 1 *Navážka zkušební vzorku premixu doplňkových látek nemá být nižší než 1 g. Při deklarovaném obsahu maduramicinu v premixu např. 1 mg/g se navažuje 1,5 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba extrakt po vytřepání ředit extrakční směsí (14) na požadovanou koncentraci přibližně 6 µg/ml. Navážka zkušební vzorku krmné směsi nemá být nižší než 25 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba extrakt po vytřepání ředit extrakční směsí (14) na požadovanou koncentraci přibližně 6 µg/ml.*
- 2 *Vzorek po extrakci je stabilní při teplotě 4 °C po dobu asi 48 h.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10340.1 – Stanovení obsahu maduramicinu a semduramicinu metodou HPLC	Revize	1

5.2 Přechištění na pevné fázi

Základní substance, tritiráty a premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu semduramicinu nebo maduramicinu se extrakt získaný podle 5.1 naředí roztokem acetonitrilu (13) na koncentraci asi 25 mg/l.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (8) po dobu 3 min při 10000 ot/min.

Krmné směsi

Na extrakční jednotku (3) se nasadí kolonka Silica (5), kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku octanu ethylnatého (3) a poté se na kolonku nanese 10,0 ml extraktu získaného podle 5.1. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 × 4 ml promývacího roztoku (6) a poté se maduramicin nebo semduramicin eluují do 10ml vialky 10 ml elučního roztoku (8). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků (4) pod proudem dusíku při 50 °C, odparek se zalije 2,0 ml roztoku acetonitrilu (13), promíchá, rozpustí 30 s v ultrazvukové lázni (7) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (8) po dobu 5 min při 10 000 ot/min.

5.3 Stanovení HPLC

Chromatografické podmínky

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému (1) – postkolonová derivatizace (6).


Následující podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně:

Kapacitní faktor $k \geq 2,5$.

Tailing faktor $t_{\alpha} \leq 1,3$.

Rozlišení $R_{1,2} \geq 1,5$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10340.1 – Stanovení obsahu maduramicinu a semduramicinu metodou HPLC	Revize	1

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Kolona	C 18-reverzní fáze, Nova-Pak C ₁₈ ,4 μm, 50 mm × 3,9 mm nebo podobná
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Teplota kolony	38 °C
Průtok derivatizačního činidla	0,8 ml/min
Objem derivatizační smyčky	1000 μl
Teplota systému	(90 ± 2) °C
Detektor UV	598 nm (poznámka 3)
Objem nástřiku	100 μl

Poznámky

3 Pro stanovení maduramicinu lze použít i fluorometrické detekce: $E_x = 224 \text{ nm}$, $E_m = 515 \text{ nm}$

Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk ml se pipetuje (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního roztoku maduramicinu nebo semduramicinu (20), doplní se roztokem acetonitrilu (13) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci (2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 40,0) mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 150 μl kalibračního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch pík se sestrojí kalibrační křivka.

6 Výpočet

Obsah maduramicinu nebo semduramicinu (X) v mg/kg se vypočítá podle vztahu

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

kde

C je koncentrace maduramicinu ve zkoušeném vzorku v μg/ml zjištěná z kalibračního grafu,

V objem extraktu vzorku v ml,

R faktor ředění,

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou paralelních stanovení.