	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10341.1– Stanovení obsahu maduramicinu metodou HPLC	Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU MADURAMICINU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení maduramicinu v krmivech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Poznámky

- Pro účely této metody se používá tato definice: Amonná sůl maduramicinu je monoglykosidní polyetherové ionoforové antibiotikum sumárního vzorce $C_{47}H_{83}NO_{17}$.*
- Obvyklá koncentrace maduramicinu v krmivech je 5 mg/kg, v premixech 500 mg/kg. Při validaci normované metody byla určena mez stanovitelnosti 2 mg/kg a mez detekce 0,5 mg/kg. Daným postupem může být dosaženo nižší meze stanovitelnosti, ale musí být validována uživatelem.*


2 Princip

Obsah maduramicinu 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 pouze chemikálie zaručené analytické čistoty, není-li určeno jinak.

- Voda, stupeň 1 podle EN ISO 3696.
- Methanol, CH_3OH , čistota HPLC.
- Octan ethylnatý, $C_4H_8O_2$, čistota > 99,5 %.
- Hexan, C_6H_{14} , čistota > 90 %.
- Extrakční roztok pro krmné směsi.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 200 ml octanu etylnatého (3), doplní se hexanem (4) po značku a promíchá se.
- Dichlormethan, CH_2Cl_2 , čistota > 99,5 %.
- Aceton, CH_3COCH_3 , čistota > 99,5 %.
- Promývací roztok aceton – dichlormethan.
Příprava: Do 250ml odměrné baňky se odměří 10 ml acetonu (7) a doplní se po značku dichlormethanem (6) a promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10341.1– Stanovení obsahu maduramicinu metodou HPLC	Revize	2

- 9 Eluční roztok – roztok methanolu v dichlormethanu.
 Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 30 ml methanolu (2), doplní dichlormethanem (6) po značku a promíchá.
- 10 1,5- dimethylhexylamin, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.
- 11 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , čistota přibližně 85 % objemových.
- 12 Kyselina fosforečná, zředěná.
 Příprava: 10 ml kyseliny fosforečné (11) se doplní na objem 100 ml vodou (1).
- 13 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 .
- 14 Fosforečnanový tlumivý roztok, $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 10 \text{ mmol/l}$, pH 4,0.
 Příprava: Rozpustí se 1,36 g dihydrogenfosforečnanu draselného (13) v 500 ml vody (1). Přidá se 3,0 ml kyseliny fosforečné (11) a 10 ml 1,5-dimethylhexylaminu (10). Upraví se pH na 4,0 zředěnou kyselinou fosforečnou (12) a doplní se vodou (1) na objem 1 000 ml. Roztok může být skladován několik týdnů, ale v případě mikrobiálního nárůstu se musí připravit nový.
- 15 Mobilní fáze.
 Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 100 ml fosforečného tlumivého roztoku (14), doplní se methanolem (2) po značku a promíchá.
- 16 Kyselina sírová, H_2SO_4 , $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,83 \text{ g/ml}$.
- 17 Dimethylaminobenzaldehyd (DMBA), $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$, (citlivý na světlo), minimální čistota 99 %. Po ověření se může použít i DMBA s čistotou 98 %.
- 18 Derivatizační činidlo.
 Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 250 ml methanolu (2), opatrně se přidá 15,0 ml kyseliny sírové (16) (chlazení!) a v této směsi se rozpustí 15 g p-DMBA (17), ochladí se na laboratorní teplotu, doplní methanolem (2) po značku a promíchá. Směs se uchovává v chladu při teplotě do 10°C a ve tmě. Je stabilní nejvýše 28 dní.
- 19 Maduramicin, amonná sůl, $\text{C}_{47}\text{H}_{83}\text{NO}_{17}$, čistota min. 95,5 %.
- 20 Maduramicin, základní standardní roztok, $100 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží takové množství základní substance maduramicinu (19), aby výsledná koncentrace byla $100 \mu\text{g/ml}$. Rozpustí se v methanolu (2), doplní po značku a promíchá. Skladuje se při teplotě pod 4°C . Připravuje se čerstvý každý měsíc.
- 21 Maduramicin, pracovní standardní roztok, $10 \mu\text{g/ml}$.
 Příprava: Do 100ml odměrné baňky se odměří 10 ml zásobního standardního roztoku (20) a doplní se methanolem (2) po značku a promíchá. Skladuje se při teplotě pod 4°C . Připravuje se čerstvý každý týden.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10341.1– Stanovení obsahu maduramicinu metodou HPLC	Revize	2

Poznámky

- 3 *Se všemi rozpouštědly a roztoky se pracuje jen v digestoři. Používají se bezpečnostní brýle, ochranný oděv a je nutné vyhnout se kontaktu s kůží.*
- 4 *Maduramicin je velmi toxický. Je třeba vyhnout se vdechnutí a expozici toxickému standardnímu materiálu a jeho roztoků.*
- 5 *Roztoky maduramicinu se musejí chránit před přímým světlem.*

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový vysokoúčinný chromatograf 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 derivatizaci (dvojitá pumpa nebo dvě jednoduché pumpy) se směšovací komorou, reakční smyčkou z inertního materiálu (např. Teflon® nebo Peek®) pro práci při 95 °C, 7,0 m, ID = 0,33 mm a vodní lázní nebo reaktorem pro práci při 95 °C.
- 7 Ultrazvuková lázeň.
- 8 Laboratorní odstředivka.
- 9 Membránový filtr, PTFE, průměr pórů v rozmezí 0,20 µm – 0,45 µm.

Poznámky

- 6 *V postkolonovém reaktoru a detektoru nesmějí být použity nerezové ocelové trubice.*

5 Postup


5.1 Příprava zkušební vzorku

Vzorky se připraví podle JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu.

Vzorek se homogenizuje a upravuje na částice o velikosti 0,5 mm až 1,0 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během přípravy. Vzorek se upravuje těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zamezilo ztrátám maduramicinu.

Poznámky

- 7 *Maduramicin je velmi toxický. Je třeba vyvarovat se vdechnutí a expozici toxickému materiálu při mletí vzorku.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10341.1– Stanovení obsahu maduramicinu metodou HPLC	Revize	2

5.2 Extrakce

5.2.1 Krmiva

Do 250ml odměrné baňky se naváží 30 g umletého vzorku (velikost částic ≤ 1 mm) s přesností na nejbližší 0,01 g. Přidá se 100 ml extrakčního roztoku pro krmné směsi (5). Baňka se vhodným způsobem uzavře a umístí se na 20 min do ultrazvukové lázně při 50 °C. Důkladně se protřepe na třepače, v průběhu asi 15 min se nechá vychladnout na laboratorní teplotu. Alikvotní část se odstřeďuje 1 min až 2 min nebo se zfiltruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

5.2.2 Premixy

Do 250ml odměrné baňky se se naváží 2 g až 10 g umletého vzorku (velikost částic $\leq 0,5$ mm) s přesností na nejbližší 0,01 g a přidá se 100 ml methanolu (2). Baňka se uzavře a umístí se na 20 min do ultrazvukové lázně při 50 °C. Nechá se vychladnout na laboratorní teplotu, potom se důkladně protřepe na třepače, ponechá se na několik min v klidu. Alikvotní podíl čirého supernatantu se zředí na potřebnou koncentraci methanolem. Alikvotní část se odstřeďuje 1 min až 2 min nebo se zfiltruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

Po membránové filtraci se 100 μ l tohoto roztoku nastříkne do HPLC přístroje.

Poznámky

- 8 *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 methanolem (2) na požadovanou koncentraci přibližně 6 μ g/ml. Navážka zkušební vzorku krmné směsi nemá být nižší než 25 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba extrakt po vytřepání ředit methanolem na vhodnou koncentraci.*
- 9 *Vzorek po extrakci je stabilní při teplotě 4 °C po dobu asi 48 h.*


5.3 Přečištění na pevné fázi

Na extrakční jednotku se nasadí kolonka Silica, kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku pro krmné směsi (5) a poté se na kolonku nanese 10,0 ml extraktu získaného podle 5.2.1. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 \times 4 ml promývacího roztoku (8) a poté se maduramicin eluuje do 10ml vialky 10 ml elučního roztoku (9). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků pod proudem dusíku při 50 °C, odparek se zalije 2,0 ml methanolu (2), promíchá, rozpustí 30 s v ultrazvukové lázni a vytemperuje na laboratorní teplotu.

Po membránové filtraci (9) se 100 μ l tohoto roztoku nastříkne do HPLC přístroje.

Poznámky

- 10 *Postup 5.3 se použije pouze pro krmné směsi.*
- 11 *Extrakt vzorku se také může zbavit tuku tak, že se ochladí po dobu (2 – 3) h na minus 18 °C.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10341.1– Stanovení obsahu maduramicinu metodou HPLC	Revize	2

5.4 Příprava kalibračních roztoků

Do série 50ml odměrných baněk se přenese (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10) ml pracovního standardního roztoku (21). Baňky se doplní po značku methanolem (2) a promíchají. Koncentrace těchto roztoků odpovídají (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,6; 2,0) μg maduramicinu/1 ml. Alternativně se může použít 5 kalibračních roztoků s koncentracemi (0,4; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0) μg maduramicinu/1 ml. Kalibrační roztoky se musejí připravit v den analýzy.

Poznámky

12 *Byla také ověřena kalibrační křivka v rozsahu (2,0 – 40,0) $\mu\text{g}/\text{ml}$.*

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 10,0) ml základního roztoku maduramicinu (20), doplní se roztokem methanolu (2) 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 100 μl kalibračního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

5.5 Stanovení HPLC

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


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 $t_a \leq 1,3$.

Rozlišení $R_{1,2} \geq 1,5$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10341.1– Stanovení obsahu maduramicinu metodou HPLC	Strana	6
		Vydání	1
		Revize	2

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Kolona	C 18-reverzní fáze, Nova-Pak C18,4 µm, 50 mm × 3,9 mm nebo podobná
Mobilní fáze	(15)
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Teplota kolony	40 °C nebo laboratorní teplota
Průtok derivatizačního činidla	0,8 ml/min (0,4 ml/ml)
Objem derivatizační smyčky	1000 µl
Teplota systému	(95 ± 2) ° C
Detektor UV	598 nm
Objem nástřiku	100 µl

Poznámky

13 Pro stanovení maduramicinu lze použít i fluorometrické detekce: excitační vlnová délka $E_x = 224 \text{ nm}$, emisní vlnová délka $E_m = 515 \text{ nm}$.

Stabilita chromatografického systému se kontroluje několikanásobným nástřikem kalibračního roztoku obsahujícího 1,0 µg/ml, dokud není dosaženo konstantních ploch píků a retenčních časů. Práce v popsaných podmínkách umožňuje oddělení maduramicinu od ostatních ionoforů jako salinomycin, narasin, monensin a semduramicin na základní linii.

6 Výpočet výsledků

Pro výpočet hmotnostního zlomku maduramicinu (X) ve vzorku (mg/kg) se použije vztah

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

C koncentrace maduramicinu ve zkoušeném vzorku (µg/ml) zjištěná z kalibračního grafu,

V objem extraktu vzorku (ml),

R faktor ředění,

m hmotnost navážky zkušební vzorku (g).

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou paralelních stanovení.