


|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 1 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         zkoušení krmiv</b>                 | Vydání | 1 |
|   | 10342.1 – Stanovení obsahu semduramicinu metodou HPLC                          | Revize | 0 |

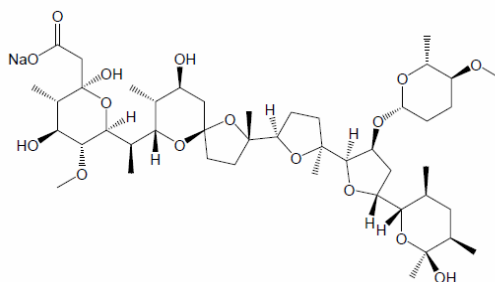
## STANOVENÍ OBSAHU SEMDURAMICINU METODOU HPLC

### 1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu semduramicinu v krmivech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v koncentračním rozsahu (2 – 30) mg/kg.

### 2 Princip

Semduramicin se extrahuje ze vzorku acetonitrem a stanoví se separací na chromatografické koloně s reverzní fází a po postkolonové derivatizaci s N, N'-dimethyl-p-aminobenzaldehydem (DMABA) se detekuje UV-detektorem.




**Obr. 1. Strukturální vzorec semduramicinu.**

### 3 Chemikálie

Používají se pouze chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná), podle ČSN ISO 3696.
- 2 Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, čistota pro HPLC.
- 3 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, čistota pro HPLC.
- 4 Mravenčan amonný, HCOONH<sub>4</sub>, čistota pro HPLC.
- 5 Mravenčan amonný, roztok, c(HCOONH<sub>4</sub>) = 100 mmol/l, pH = 3,00.

Příprava: Naváží se 6,30 g mravenčanu amonného (4) s přesností 0,01 g a rozpustí se asi v 900 ml vody (1). pH roztoku se upraví na hodnotu 3,00 pomocí kyseliny mravenčí (8) a převede se kvantitativně do 1000ml odměrné baňky. Objem se doplní vodou (1) po značku a promíchá. Při uchování v laboratorních podmínkách je roztok je stabilní minimálně 28 dní.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 2 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         zkoušení krmiv</b>                 | Vydání | 1 |
|   | 10342.1 – Stanovení obsahu semduramicinu metodou HPLC                          | Revize | 0 |

- 6 Kyselina sírová, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, koncentrovaná, ρ = 1,84 g/ml.
- 7 Dimethylaminobenzaldehyd (DMABA), čistota nejméně 99 %.
- 8 Kyselina mravenčí HCOOH, čistota nejméně 98 %.
- 9 Derivatizační činidlo.

Příprava: Do odměrné baňky o objemu 500 ml se odměří 250 ml methanolu (3), opatrně se za chlazení (např. proudem studené vody) přidá 15,0 ml kyseliny sírové (6). V této směsi se rozpustí 15 g (naváženého s přesností na 0,1 g) DMABA (7), obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3) po značku a promíchá. Roztok se přefiltruje pod tlakem za použití filtračního přístroje. Při uchování ve tmě při teplotě do 8 °C (v chladničce) je derivatizační činidlo stabilní minimálně 28 dní.

- 10 Mobilní fáze.

Příprava: Smíchá se methanol (3) a roztok mravenčanu amonného (5) v poměru 90 + 10 (v + v). Vzniklý roztok se odvzdušní v ultrazvukové lázni a přefiltruje se pod tlakem za použití filtračního přístroje.

- 11 Semduramicinát sodný C<sub>45</sub>H<sub>75</sub>O<sub>16</sub>Na; CAS č.:119068-77-8, M<sub>r</sub> = 895,1; minimální čistota standardu 93 % (vyjádřeno jako semduramicin).
- 12 Semduramicin, standardní roztok, c = 1 mg/ml.

Příprava: Do 10ml odměrné baňky se s přesností 0,1 mg naváží 10 mg standardu semduramicinátu sodného (11), rozpustí se v methanolu (3) a doplní methanolem (3) po značku. Při uchování ve tmě při teplotě asi od 4 °C do 8 °C (v chladničce) je standardní roztok semduramicinu stabilní minimálně 1 rok.

Přesná koncentrace semduramicinu ve standardním roztoku se vypočte podle vztahu

$$C_s = \frac{m}{10} \times P$$


C<sub>s</sub> přesná koncentrace semduramicinu ve standardním roztoku v mg/ml;

P čistota standardu (11) vyjádřená jako semduramicin v %,

m hmotnost navážky standardu semduramicinátu sodného v mg (11).

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností na 0,001 g.
- 2 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí (HPLC).
- 3 Zařízení pro postkolonovou derivatizaci.
- 4 Laboratorní třepačka, (150 – 180 kmitů/s).
- 5 Stříkačkové filtry, velikost pórů 0,45 μm, Nylon; nebo podobné.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 3 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         zkoušení krmiv</b>                 | Vydání | 1 |
|   | 10342.1 – Stanovení obsahu semduramicinu metodou HPLC                          | Revize | 0 |

- 6 pH metr.
- 7 Homogenizační mlýn.
- 8 Filtrační systém pro rozpouštědlo, celoskleněný filtrační přístroj vhodný pro 47mm filtry.

## 5 Postup

### 5.1 Příprava vzorku

Vzorky se upraví podle JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

Vzorek se homogenizuje a upravuje na částice o velikosti (0,5 – 1,0) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku. Vzorek se upravuje bezprostředně před extrakcí a dalším zpracováním, aby nedošlo ke ztrátám semduramicinu. Vzorky krmiv se musejí chránit před přímým slunečním zářením a UV světlem.

### 5.2 Příprava pozitivních a negativních kontrolních vzorků

Do každé série vzorků se zařadí pozitivní kontrolní vzorek (PKV) a negativní kontrolní vzorek (NKV).

Pro přípravu PKV se naváží 5,0 g ± 0,1 g krmiva bez obsahu semduramicinu, ke kterému se přidá 50 µl až 130 µl standardního roztoku semduramicinu (12), tj. asi 10 mg/kg až asi 26 mg/kg. Vzorek se důkladně promíchá a přídavek standardu se nechá penetrovat do krmiva nejméně 1 h před extrakcí.

Pro přípravu NKV se naváží 5,0 g ± 0,1 g krmiva bez obsahu semduramicinu.

### 5.3 Extrakce

Do 50ml plastové centrifugační tuby s uzávěrem se naváží asi 5 g upraveného vzorku (podle 5.1) s přesností na 0,1 g. Přidá se 15,0 ml acetonitrilu (2), tuba se pevně uzavře a zkontroluje se její těsnost. Důkladně se ručně protřepe, aby se vytvořila suspenze vzorku v rozpouštědle. Potom se třepe 30 min na rotační třepačce při (150 – 180) kmitů/s.


Pozitivní kontrolní vzorky a negativní kontrolní vzorky se extrahují společně v sérii se vzorky.

Extrakt se vyjme z třepačky, nechá se usadit a supernatant se přefiltruje přes nylonový stříkačkový filtr 0,45 µm. Takto připravený roztok se nastříkne do HPLC přístroje.

### 5.4 Kalibrace

#### Příprava kalibračních roztoků

Do série 25ml odměrných baněk se pipetuje (13; 25; 38; 60; 160; 260; 360; 460) µl standardního roztoku semduramicinu (12), doplní se po značku acetonitrilem (2) a promíchá. Tyto roztoky odpovídají koncentracím (0,52; 1,0; 1,52; 2,4; 6,4; 10,4; 14,4; 18,4) mg/l semduramicinu.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 4 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         zkoušení krmiv</b>                 | Vydání | 1 |
|   | 10342.1 – Stanovení obsahu semduramicinu metodou HPLC                          | Revize | 0 |

S ohledem na očekávaný obsah semduramicinu je možné kalibrační křivku upravit.

Při uchování při teplotě do 8 °C (v chladničce) jsou kalibrační roztoky stále minimálně 1 týden.

Na chromatografickou kolonu se po ustálení systému postupně dávkuje 100 µl jednotlivých kalibračních roztoků s postupně zvyšující se koncentrací. Z naměřených hodnot ploch pík je sestrojena kalibrační křivka pomocí validovaného software (HPLC).


### 5.5 Měření obsahu semduramicinu

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za separačních podmínek chromatografického systému - postkolonová deprivatizace, které uvádí tabulka 1. Tyto podmínky jsou doporučené. Mohou se použít i jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

**Tabulka 1. Chromatografické podmínky – příklad.**

|  |  |
|--|--|
| Kolona   | DISCOVERY HS - C18, 5 µm, (150 × 4,6) mm<br>nebo podobná |
| Průtok mobilní fáze                            | 0,7 ml/min   |
| Teplota kolony                                 | 38 °C  |
| Průtok derivatizačního činidla                 | 0,9 ml/min   |
| Objem derivatizační smyčky                     | 1400 µl  |
| Teplota derivatizačního postkolonového systému | (90 ± 2) °C  |
| Detektor UV                                    | 598 nm   |
| Objem nástřiku                                 | 100 µl   |
| Retenční čas semduramicinu                     | 8,12 min   |
| Doba analýzy                                   | 25 min   |

V každé sérii vzorků se provede i stanovení pozitivního i negativní kontrolního vzorku a vhodného IRM.

|   |  |        |   |
|---|--|--------|---|
|  | Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<br>Národní referenční laboratoř | Strana | 5 |
|   | <b>Jednotné pracovní postupy –<br/>         zkoušení krmiv</b>                 | Vydání | 1 |
|   | 10342.1 – Stanovení obsahu semduramicinu metodou HPLC                          | Revize | 0 |

## 6 Výpočet

Obsah semduramicinátu sodného vyjádřeného hmotnostním zlomkem v mg/kg ( $w_D$ ) se vypočte podle vztahu

$$w_D = \frac{c \times V \times R}{m} \quad (\text{mg/kg})$$

kde

c koncentrace semduramicinu odečtená z kalibračního grafu (mg/l),

V objem odměrné baňky se zásobním roztokem vzorku (ml), pro tento postup 15 ml,

R faktor ředění,

m navážka vzorku (g), pro tento postup 5 g.

Za výsledek se považuje průměrná hodnota získaná ze dvou paralelních stanovení. Výsledek se zaokrouhluje na 2 desetinná místa.