

## STANOVENÍ SEMDURAMICINU A MADURAMICINU V PREMIXECH A KOMPLETNÍCH KRMIVECH METODOU HPLC S POSTKOLONOVOU DERIVATIZACÍ

### 1. Definice

Semduramicin a maduramicin se řadí mezi ionophorní polyetherické monokarboxylové kyseliny (dále jen PEs). Používají jako doplňkové látky k prevenci kokcidiózy drůbeže a do krmných směsí jsou přidávány ve formě svých solí v obsazích 5-25 mg/kg.

### 2. Princip

Semduramicin a maduramicin je extrahován směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý a extrakt je přečištěn na pevné fázi silica a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu rozpouštědla voda-acetonitril, separován na chromatografické koloně s reverzní fází  $C_{18}$  a po postkolonové derivatizaci s p-dimethylaminobenzaldehydem při 90 °C detekován UV-detektorem při vlnové délce 598 nm.

### 3. Chemikálie

- 3.1** Octan ethylnatý; čistoty > 99,5 %,  $C_4H_8O_2$ ,  $M_r = 88,11$
- 3.2** Hexan; čistoty > 90 %,  $C_6H_{14}$ ,  $M_r = 86,18$
- 3.3** Extrakční roztok 20 % octanu ethylnatého v hexanu: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml octanu ethylnatého (3.1), doplní n-hexanem (3.2) po značku a promíchá.
- 3.4** Dichlormethan; čistoty > 99,5 %,  $CH_2Cl_2$ ,  $M_r = 84,9$
- 3.5** Aceton; čistoty > 99,5 %,  $CH_3COCH_3$ ,  $M_r = 58,1$
- 3.6** Promývací roztok aceton-dichlormethan (4 %; 960+40): Do odměrné baňky na 250 ml se odměří 10 ml acetonu (3.5) a doplní se po značku dichlormethanem (3.4) a promíchá.
- 3.7** Methanol, HPLC grade
- 3.8** Eluční roztok – 6 % roztok methanolu v dichlormethanu: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 30 ml methanolu (3.7), doplní dichlormethanem (3.4) po značku a promíchá.
- 3.9** Acetonitril, HPLC grade
- 3.10** Tetrahydrofuran, HPLC grade
- 3.11** Kyselina fosforečná,  $H_3PO_4$  85 %,  $\rho = 1,71 \text{ g.cm}^{-3}$
- 3.12** Mobilní fáze: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 190,0 ml vody, přidá se 100,0 ml tetrahydrofuranu (3.10), 2,0 ml kyseliny fosforečné (3.11), doplní acetonitrem (3.9) po značku a promíchá.
- 3.13** 70 % acetonitril ve vodě: V odměrné baňce na 500 ml se smíchá 350 ml acetonitrilu (3.9)

a 200 ml vody a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou po značku.

- 3.14** Extrakční roztok premixy: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml vody, přidá se 700 ml methanolu (3.7) a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní methanolem (3.7) po značku a promíchá.
- 3.15** p-N,N'-dimethylaminobenzaldehyd /p-DMBA/,  $C_9H_{11}NO$ ,  $M_r = 149,2$ , Sigma, D-8904, (light sensitive)
- 3.16** Kyselina sírová,  $H_2SO_4$ ,  $\rho = 1,83 \text{ g.cm}^{-3}$ ,  $M_r = 98,07$ , HPLC grade nebo ch.č.
- 3.17** Derivatizační činidlo: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 250 ml methanolu (3.1), opatrně se přidá 15,0 ml kyseliny sírové (3.3) /chlazení !/ a v této směsi se rozpustí 15 g p-DMBA (3.10), ochladí se na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.1) po značku a promíchá. Směs se uchovává v chladu (při teplotě do  $10^\circ\text{C}$ ) a ve tmě. Stabilní maximálně 28 dní.
- 3.18** Maduramicin, 95,5 %, sodná sůl  $C_{47}H_{79}O_{17}Na$ ,  $M_r = 934,17$
- 3.19** Semduramicin, 98 %,  $C_{45}H_{75}O_{16}$ ,  $M_r = 895$ , PFIZER
- 3.20** Základní roztok PEs: Do odměrné baňky na 100 ml se naváží takové množství základní substance maduramicinu (3.18) a semduramicinu (3.19), aby výsledná koncentrace byla 200 mg/l. Rozpustí se v methanolu (3.7), doplní po značku a promíchá.
- 3.21** Patrony Silica pro SPE, např. Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520

#### 4. Pracovní postup

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 až 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a šrotování a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám semduramicinu. Roztoky semduramicinu se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV.

##### 4.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 0,5 mg semduramicinu nebo maduramicinu s přesností na 0,001 g:

- 0,5 g pro základní substanci a triturat
- 2 až 10 g pro premixy doplňkových látek
- 30 g pro krmné směsi.

Pro extrakci základní látky nebo triturátu se přidá 200 ml extrakčního roztoku (3.14), pro extrakci premixů doplňkových látek se přidá 100,0 ml extrakčního roztoku (3.14) a pro extrakci krmných směsí se přidá se 100,0 ml extrakčního roztoku hexan - octan ethylnatý (3.3).

Baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

#### **4.2 Přečištění extraktu na pevné fázi Silica - krmné směsi**

Na extrakční jednotku se nasadí kolonka Silica (3.21), kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku 20 % octanu ethylnatého (3.3) a poté se na kolonku nanese 10,0 ml extraktu získaného podle čl. 4.1. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 krát 4 ml promývacího roztoku (3.6) a poté se PEs eluuje do 10 ml vialky 10 ml elučního roztoku (3.8). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků pod proudem dusíku při 50 °C, odparek se zalije 2,0 ml 70 % acetonitrilu (3.13), promíchá, rozpustí na ultrazvuku (30 s) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 5 minut při 10 000 ot/min.

#### **4.3 Základní substance, trituráty a premixy doplňkových látek**

Podle deklarovaného obsahu semduramicinu nebo maduramicinu se extrakt získaný podle čl. 4.1 naředění 70 % acetonitrem (3.13) na koncentraci asi 25 mg/l.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 8000 ot/min.

### **5. Kalibrace a chromatografické podmínky**

Do sady odměrných baněk na 25 ml se pipetuje 0,25 – 0,5 – 1,0 – 2,0 a 5,0 ml základního roztoku PEs (3.20), doplní 70 % acetonitrem (3.13) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci 2,0- 4,0 - 8,0 - 16,0 a 40,0 mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 150 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému - postkolonová derivatizace:

Kolona: požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně : kapacitní faktor  $k \geq 2,5$ , tailing faktor  $t_{\alpha} \leq 1,3$ , rozlišení  $R_{1,2} \geq 1,5$ . Doporučená kolona: C<sub>18</sub>-reverzní fáze, Nova-Pak C<sub>18</sub>, 4 µm, 50x3,9 mm

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

Objem nástřiku: 100 µl

## 6. Výpočet

Obsah PEs (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot R}{m_a}$$

kde **c** je koncentrace PEs odečtená z kalibrační křivky v **mg/l**

**m<sub>a</sub>** hmotnost zkušební vzorku v **g**

**V** objem extraktu v **ml**

**R** ředění, resp. zakoncentrování