

Stanovení virginiamycinu metodou HPLC

1. Definice

Virginiamycin je vícesložkový komplex produkovaný *Streptomyces virginiae* s majoritní složkou virginiamycinu M_1 a S_1 .

Používají jako růstový stimulator drůbeže, prasat a telat. Do krmných směsí je přidáván v obsazích 5-80 mg/kg. Stanoví se po extrakci dichlormethanem a po přečištění na pevné fázi silica a převedení do mobilní fáze na reverzní fázi C_{18} s UV a fluorescenční (FL) detekcí on-line.

2. Chemikálie

- 2.1** Acetonitril HPLC grade
- 2.2** Dichlormethan; čistoty > 99,5 %, CH_2Cl_2
- 2.3** Aceton; čistoty > 99,5 %, CH_3COCH_3
- 2.4** Promývací roztok: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 40,0 ml acetonu (2.3) a doplní dichlormethanem (2.2) po značku a promíchá.
- 2.5** Kyselina fosforečná, koncentrovaná 85 %, $\rho = 1,71 \text{ g.cm}^{-3}$
- 2.6** Mobilní fáze: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 480 ml acetonitrilu (2.1), přidá se 250 ml vody a 1 ml H_3PO_4 (2.5), doplní vodou po značku a promíchá.
- 2.7** Ředící roztok: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 700 ml acetonitrilu (2.1), doplní vodou po značku a promíchá.
- 2.8** Patrony Silica pro SPE, (Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520)
- 2.9** Standardní substance virginimycinu
- 2.10** Základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží takové množství standardní substance virginimycinu aby **1 ml** roztoku obsahoval **0,2 mg** virginimycinu v sumě složek M_1 a S_1 , rozpustí v acetonitrilu, doplní acetonitrilem po značku a promíchá.

3. 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 virginiamycinu.

3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 0,5 až 25 mg virginiamycinu s přesností na 0,001 g. Zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100,0 ml dichlormethanu (2.2), baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce 45 minut. Poté se nechá rozpouštět 5 minut na ultrazvuku a následně se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

3.2 Vlastní stanovení

3.2.1 Čistá látka, triturat a premixy doplňkových látek (obsah > 600 mg/kg)

Z extraktu získaného podle čl. 3.1 se napipetuje do odměrné baňky na 10 ml až 25 ml tak, aby výsledná koncentrace byla asi 10 mg/l. Odpaří se pod proudem dusíku k suchu a doplní ředícím roztokem (2.7) po značku, 1 minutu se rozpouští na ultrazvuku a promíchá.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 10 000 ot/min nebo se přefiltruje přes membránový filtr.

3.2.2 Krmné směsi - přečištění na SPE Silica

Patrony Silica se kondicionují 5 ml dichlormethanu (2.2) a na patronu se nanese 1,0 až 10,0 ml extraktu získaného podle čl. 3.1. Extrakt se nechá vsáknout a promývá se 3krát 4 ml promývacího roztoku (2.4). Patrona se nechá 20 minut prosávat dusíkem nebo vzduchem.

Virginiamycin se eluuje do odměrné baňky na 2,0 až 10,0 ml elučním roztokem (2.7) po značku tak, aby výsledná koncentrace byla asi 10 mg/l. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 10 000 ot/min nebo se přefiltruje přes membránový filtr.

3.3 Stanovení HPLC

3.3.1 Chromatografické podmínky

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

Kolona: Nova-Pak C₁₈, 4 μm, 250x4,6 mm
 Mobilní fáze: Eluent A: acetonitril (2.1)
 Eluent B: mobilní fáze (2.6)

Gradientová tabulka:

#	Čas	Průtok (ml)	%A	%B
1	0,00	1,00	0,0	100,0
2	1,00	1,00	0,0	100,0
3	12,00	1,00	0,0	100,0
4	12,50	1,40	100,0	0,0
5	18,50	1,40	100,0	0,0
6	19,00	1,00	0,0	100,0
7	24,00	1,00	0,0	100,0
8	29,00	1,00	0,0	100,0
9	30,00	1,00	100,0	0,0
10	150,00	1,00	100,0	0,0
11	151,00	0,00	100,0	0,0

Teplota kolony: 45 °C
 Objem nástřiku: 20 μl
 Detektor ^{**) UV: 235 nm}
 FL: excitační: 311 nm; emisní: 427 nm
 RunTime: 24 minut (pro uvedenou kolonu a teplotu)
 RetTime : Virginiamycin M₁ 4,4 minut
 Virginiamycin S₁ 8,9 minut

Poznámka: ^{**) Oba detektory jsou zapojeny on-line}

3.3.2 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se postupně pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml základního roztoku virginiamycinu (2.10), odměrné baňky se doplní ředícím roztokem (2.7) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 2 až 20 mg/l.

Na chromatografickou kolonu se nanáší 20 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

4. Výpočet

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

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

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

m_a hmotnost zkušební vzorku v g

V objem extraktu v ml

R ředění, resp. zakoncentrování