 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10350.1 – Stanovení obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

## STANOVENÍ OBSAHU MONENSINU, SALINOMYCINU A NARASINU METODOU HPLC

### 1 Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu vedle sebe v krmivech metodou HPLC.

Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

### 2 Princip

Obsah monensinu, salinomycinu a narasinu se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem a přečištění na pevné fázi metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s postkolonovou derivatizací dimethylaminobenzaldehydem (DMBA) a UV detekcí při 598 nm.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Voda, čistota HPLC.
- 2 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, čistota HPLC.
- 3 Dichlormethan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ρ(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 1,32 g/ml.
- 4 Kyselina sírová, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ρ(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 1,83 g/ml, čistota HPLC nebo p. a.
- 5 Octan ethylnatý, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>.
- 6 n-Hexan, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.
- 7 Aceton, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>.
- 8 Kyselina octová, čistota HPLC, CH<sub>3</sub>COOH, ρ(CH<sub>3</sub>COOH) = 1,05 g/ml.
- 9 Kyselina octová, CH<sub>3</sub>COOH, roztok.

Příprava: Ve 100ml odměrné baňce se smísí 70 ml vody a 5,0 ml kyseliny octové (8), vytemperuje na laboratorní teplotu, vodou se doplní po značku a promíchá.

- 10 Mobilní fáze.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce se smísí asi 925 ml methanolu (2) a 75,0 ml kyseliny octové (9), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (2) po značku a promíchá.

- 11 p-N,N'-dimethylaminobenzaldehyd (DMBA), C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO, minimální čistota 99 %.  
Je citlivý na světlo.
- 12 Derivatizační činidlo.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10350.1 – Stanovení obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 250 ml methanolu (2), opatrně se přidá 15,0 ml kyseliny sírové (4) (chlazení!) a v této směsi se rozpustí 17,5 g DMBA (11), vytemperuje se na laboratorní teplotu, doplní methanolem (2) po značku a promíchá. Směs se uchovává při teplotě do 10 °C a ve tmě. Stabilní je nejvýše 21 dní.

- 13 Monensin, sodná sůl, monohydrát,  $C_{36}H_{61}O_{11}Na \cdot H_2O$ ,  $M_r = 710,88$ , CAS 22373-78-0, standardní substance.
- 14 Salinomycin, sodná sůl, hydrát,  $C_{42}H_{69}O_{11}Na \cdot 2,5H_2O$ , nebo salinomycin, sodná sůl, bezvodá forma,  $C_{42}H_{69}O_{11}Na$ ,  $M_r = 772,99$ , CAS 55721-31-8.
- 15 Narasin,  $C_{43}H_{72}O_{11}$ ,  $M_r = 765,05$ , CAS 55134-13-9.
- 16 Základní roztok, směsný.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží postupně takové množství monensinu (13), salinomycinu (14) a narasinu (15), aby výsledná koncentrace odpovídala 0,2 mg sodných solí monensinu a salinomycinu a 0,2 mg narasinu v 1 ml. Baňka se doplní methanolem (2) po značku a promíchá. Přípravuje se každý měsíc čerstvý. Uchovává se v lednici. Při přípravě a skladování se minimalizuje přístup světla.

- 17 Kolonky pro SPE 500 mg Silica, např. Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520.
- 18 Methanol, vodný roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 100,0 ml vody, přidá se 800 ml methanolu (2), promíchá, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (2) po značku a promíchá.

- 19 Extrakční roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 200 ml octanu ethylnatého (5), doplní n-hexanem (6) po značku a promíchá.

- 20 Promývací roztok pro SPE.


Příprava: Do 250ml odměrné baňky se odměří 12,5 ml acetonu (7), doplní dichlormethanem (3) po značku a promíchá.

- 21 Eluční roztok pro SPE.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 40,0 ml methanolu (2), doplní dichlormethanem (3) po značku a promíchá.

## Poznámky

- 1 *Po prokazatelném odzkoušení se používá i p-N,N'- dimethylaminobenzaldehyd minimální čistoty 98 %.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10350.1 – Stanovení obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

## 4 Přístroje

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí a se zařízením na postkolonovou derivatizaci.
- 2 Třepačka mechanická laboratorní.
- 3 Koncentrátor vzorků.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Odstředivka laboratorní.
- 6 Extrakční jednotka.
- 7 Nástříkový filtr, např. nylon 0,45 µm, 17 mm.
- 8 Analytické váhy s minimální přesností 0,1 mg.

## 5 Postup

### 5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.


Vzorek se homogenizuje a upraví na částice o velikosti 0,5 mm až 1,0 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku. Vzorek se upravuje těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám monensinu, salinomycinu a narasinu. Roztoky monensinu, salinomycinu a narasinu se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV záření. Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.

### 5.2 Extrakce a přečištění extraktu na pevné fázi

Do 250ml kónické baňky se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku, aby obsahoval asi 0,1 mg až 100 mg monensinu, salinomycinu a narasinu s přesností na 0,001 g (0,5 g základních substancí a tritúrátů; 5 g pro premixů doplňkových látek; 20 g až 30 g krmných směsí). Zkušební vzorek tritúrátu se přelije 200,0 ml vodného roztoku methanolu (18), zkušební vzorek premixu se přelije 100,0 ml vodného roztoku methanolu (18) a zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100,0 ml extrakčního roztoku (19). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 30 min na laboratorní třepačce (2). Poté se filtruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž první 2 ml až 5 ml se nepoužije.

#### Krmné směsi

Na extrakční jednotku (6) se nasadí kolonka Silica (17), kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku (19) a poté se na kolonku nanese takové množství extraktu, aby výsledná koncentrace byla v rozmezí 3 mg/l až 25 mg/l, nejvýše však 5 ml extraktu získaného podle 5.2. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 × 4 ml promývacího roztoku (20) a poté se monensin, salinomycin a narasin eluují 8 ml elučního roztoku (21) do 10ml vialky. Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků (3) pod proudem dusíku při 50 °C,

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10350.1 – Stanovení obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

odparek se zalije 2,0 ml až 5,0 ml vodného roztoku methanolu (18) tak, aby výsledná koncentrace byla v rozmezí 4 mg/l až 40 mg/l. Extrakt se promíchá, rozpustí se 30 s v ultrazvukové lázni (4) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (5) po dobu 5 min při 10 000 ot/min nebo se přefiltruje přes nástřikový filtr (7).

#### Trituráty a premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu se extrakt získaný podle 5.2 naředí vodným roztokem methanolu (18) tak, aby výsledná koncentrace ležela v oblasti kalibrační křivky. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (5) po dobu 3 min při 10000 ot/min nebo se přefiltruje přes nástřikový filtr (7).

#### **Poznámky**


- 2 *U vzorků s obsahem monensinu, salinomycinu a narasinu pod 5 mg/kg se SPE kolonka kondicionuje 5 ml extrakčního roztoku (19). Poté se na kolonku nanese 10 ml extraktu získaného podle 5.2 (pro krmné směsi). Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 × 6 ml promývacího roztoku (20) a poté se monensin, salinomycin a narasin eluují 8 ml elučního roztoku (21) do 10ml vialky. Dále se postupuje stejně jako u krmných směsí.*

#### **5.3 Kalibrace**

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního roztoku monensinu, salinomycinu a narasinu (16), doplní vodným roztokem methanolu (18) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci (4,0; 8,0; 16,0; 40,0) mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 50 µl kalibračních roztoků. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

#### **5.4 Stanovení metodou HPLC**

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému. Uvedené podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10350.1 – Stanovení obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0


**Tabulka 1. Příklad separačních podmínek chromatografického systému.**

Kolona	C <sub>18</sub> -reverzní fáze, Nova-Pak C <sub>18</sub> , 4 μm, (150 × 3,9) mm nebo obdobná
Mobilní fáze	(10)
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Teplota kolony	38 °C nebo laboratorní teplota
Průtok derivatizačního činidla	0,8 ml/min
Objem derivatizační smyčky	1000 μl
Teplota deprivatizačního postkolonového systému	(90 – 95) °C ± 2 °C
Detektor UV	598 nm
Objem nástřiku	50 μl
Retenční časy při laboratorní teplotě	4,8 min – monensin
	5,6 min – salinomycin
	6,5 min – narasin

Teplota derivatizace musí být zachována. Průtok mobilní fáze a derivatizačního činidla musí být takový, aby tlak na pumpách byl přibližně stejný nebo u derivatizačního činidla nižší než u mobilní fáze.

**Tabulka 2. Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně.**

Kapacitní faktor	$k \geq 2,5$
Tailing faktor	$t_{\alpha} \leq 1,35$
Rozlišení	monensin B/monensin A - $R \geq 1,4$
	monensin A/salinomycin - $R \geq 1,5$
	salinomycin/narasin - $R \geq 1,5$ .

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10350.1 – Stanovení obsahu monensinu, salinomycinu a narasinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

## 6 Výpočet

Obsah monensinu ( $X_M$ ) vyjádřený v mg/kg se rovná součtu obsahu monensinu A a B, které se vypočtou podle vztahu

$$X_M = \frac{c \times V \times R \times \left( 1 + \frac{A_{MB}}{A_{MA}} \times F_P \right)}{m_a}$$

- kde  $c$  je koncentrace monensinu A odečtená z kalibrační křivky pro standard monensinu A (mg/l),
- $m_a$  hmotnost zkušební vzorku (g),
- $V$  objem extraktu (ml),
- $R$  zředovací faktor,
- $F_P$  korelační faktor pro mikrobiologickou aktivitu monensinu B;  $F_P = 0,28$ ,
- $A_{MB}$  plocha píku monensinu B,
- $A_{MA}$  plocha píku monensinu A.

Obsah salinomycinu ( $X_S$ ) a narasinu ( $X_N$ ) vyjádřený v mg/kg se vypočte podle vztahu

$$X_{S(N)} = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

- kde  $c$  je koncentrace salinomycinu nebo narasinu odečtená z kalibrační křivky (mg/l),
- $m_a$  hmotnost zkušební vzorku (g),
- $V$  objem extraktu (ml),
- $R$  zředovací faktor.

## 7 Literatura

- 1 ČSN EN ISO 14183 – Krmiva – Stanovení monensinu, narasinu a salinomycinu – Metoda kapalinové chromatografie s postkolonovou derivatizací.