 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

## STANOVENÍ OBSAHU HYDROXYANALOGU D, L-METHIONINU (HMTBA) METODOU HPLC

### 1 Rozsah a účel

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení hydroxyanalogu D,L-methioninu (HMTBA) v krmivech.

### Poznámky

1 *HMTBA je hydroxyanalogem esenciální aminokyseliny D,L-methioninu. Chemicky se jedná o kyselinu 2-hydroxy-4-(methylthio) máselnou. HMTBA se dodává jako 88%, vztaheno na obsah celkové kyseliny, ovšem prakticky jde o směs mono-, di-, tri- a oligomerů. Přípravou vzorku před nástřikem do HPLC se oligomery hydrolyzou kvantitativně převedou na monomer, jehož obsah se stanovuje.*

### 2 Princip

Obsah hydroxyanalogu D,L-methioninu (HMTBA) se stanoví po extrakci vzorku směsí voda-acetonitril a následné hydrolyze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s použitím UV detekce.

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

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Methanol čistoty HPLC.

2 Acetonitril čistoty HPLC.

3 Hydroxid draselný, KOH, roztok,  $c(\text{KOH}) = 500 \text{ g/l}$ .


Příprava: V kádince o objemu 1000 ml se rozmíchá 500 g KOH ve vodě (6) a po vychladnutí se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

4 Kyselina fosforečná,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , koncentrovaná,  $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,69 \text{ g/ml}$ .

5 Kyselina fosforečná,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , roztok,  $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,03 \text{ mol/l}$ .

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s vodou (6) se přidá 2,047 ml kyseliny fosforečné (4), promíchá se a doplní vodou (6) po značku.

6 Voda destilovaná či deionisovaná, čistoty HPLC.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

- 7 Hydroxid sodný, NaOH, roztok,  $c(\text{NaOH}) = 500 \text{ g/l}$ .  
Příprava: V kádince o objemu 1000 ml se rozmíchá 500 g NaOH ve vodě (6) a po vychladnutí se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.
- 8 Extrakční směs: Acetonitril + voda, (10 + 90) (v/v).  
Příprava: V 1000ml odměrné baňce se smíchá 100 ml acetonitrilu (2) a 900 ml vody (6). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.
- 9 Mobilní fáze.  
Příprava: 90 obj. dílů roztoku kyseliny fosforečné (5) se smíchá s 10 obj. díly methanolu (1) a případně se upraví roztokem hydroxidu sodného (7) na hodnotu pH 2,5.
- 10 Hydroxyanalog D,L-methioninu (HMTBA), základní látka, např. 2-hydroxy-4-(methylthio)butyric acid calcium salt, CAS N. 4857-44-7.
- 11 Hydroxyanalog D,L-methioninu (HMTBA), základní standardní roztok.  
Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží přibližně 15 mg hydroxyanalogu D,L-methioninu (10), doplní po značku extrakční směsi (8) a promíchá.  
1 ml základního standardního roztoku obsahuje asi 0,05 mg HMTBA (podle navážky).

#### 4 Přístroje a pomůcky

- 1 Lázeň ultrazvuková nebo třepačka laboratorní.
- 2 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím.
- 3 Vysokoučinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.


#### 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.

##### 5.2 Extrakce

Do 250ml kónické baňky se naváží pro premixy doplňkových látek 1 g a pro krmné směsi 10 g vzorku. Přidá se 100 ml extrakční směsi (8) a extrahuje se 10 min v ultrazvukové lázni nebo na mechanické třepačce (1). Potom se obsah baňky nechá sedimentovat a extrakt se filtruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, případně se naředí. K další hydrolyze se odpipetují 3 ml čirého supernatantu, přidá se 86  $\mu\text{l}$  roztoku hydroxidu draselného (3) a protřepává se asi 10 s. Potom se přidá 86  $\mu\text{l}$  kyseliny fosforečné (4) a znovu protřepe. Roztok se odstředí (2) při 8 000 ot/min po dobu asi 5 min nebo se přečistí přes membránový filtr 0,45  $\mu\text{m}$ .

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

## Poznámky

- 2 *Extrakt zkušební vzorku je třeba změřit co nejdříve, protože není stabilní ani při uchovávání v lednici.*

## 5.3 Kalibrace přístroje

### 5.3.1 Příprava kalibračního roztoku

Do sady 25ml odměrných baněk se postupně pipetuje (10; 15; 20) ml základního standardního roztoku HMTBA (11) a doplní po značku extrakční směsí (8). Koncentrace kalibračních roztoků je (20; 30; 40) µg HMTBA/ml. Jednotlivé standardy se musejí, stejně jako vzorek, hydrolyzovat. Do zkumavky se odpipetují 3 ml kalibračního roztoku HMTBA, přidá se 86 µl roztoku hydroxidu draselného (3) a protřepe. Potom se přidá 86 µl kyseliny fosforečné (4) a znovu protřepe. Takto připravené kalibrační roztoky se přečistí přes membránový filtr a potom se nastříkují na chromatografickou kolonu.

### 5.3.2 Stanovení metodou HPLC


Připravené kalibrační roztoky a extrakty vzorků se měří metodou RP-HPLC při vlnové délce 214 nm. Podmínky měření závisejí na použitém přístroji a je třeba ho optimalizovat v souladu s pokyny výrobce a pro měřenou matici.

**Tabulka 1. Příklad podmínek měření.**

<b>Kolona</b>	SymmetryShield™ RP <sub>8</sub> , náplň 4µm, 150 mm × 3,9 mm nebo obdobná
<b>Mobilní fáze</b>	viz (9)
<b>Teplota kolony</b>	(20 – 25) °C
<b>Průtok</b>	0,8 ml/min
<b>Detekce</b>	UV, vlnová délka 214 nm
<b>Nástřik</b>	20 µl
<b>Doba analýzy</b>	(10 – 12) min. pro uvedené podmínky

Po ekvilibraci kolony přístroje HPLC (3) se nastříkuje kalibrační roztok i roztok zkoušeného vzorku dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků musejí být v toleranci nejvýše 2 % a bází odezvy je plocha píku.

Z průměrných hodnot odezvy kalibračního roztoku a jeho koncentrace se sestrojí kalibrační křivka.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	3
	10330.1 – Stanovení obsahu hydroxyanalogu D, L-methioninu (HMTBA) metodou HPLC	Revize	0

## Poznámky

- 3 *Při zkoušení krmných směsí je nutno před každým dalším nástřikem zajistit, aby z kolony byly odstraněny složky, jejichž retenční časy jsou někdy dvoj- až trojnásobně vyšší než retenční čas monomeru hydroxyanalogu. Vyčistění kolony lze zajistit buď dostatečným časovým odstupem mezi jednotlivými nástřiky nebo propláchnutím kolony směsí acetonitril-voda (8).*

## 6 Výpočet a vyjádření výsledku

Koncentrace analytu v roztoku zkušební vzorku se vypočte z kalibrační rovnice. Tento výpočet provádí přímo vyhodnocovací program přístroje.

Obsah HMTBA, vyjádřený jako monomer hydroxyanalogu, v mg/kg ( $X$ ) se vypočítá podle vztahu

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

kde

- $C$  je koncentrace monomeru zjištěná z kalibračního grafu  $\mu\text{g/ml}$ ,  
 $F$  faktor ředění,  
 $m$  hmotnost navážky zkušební vzorku v g,  
 $V$  objem extraktu v ml.

## Poznámky

- 4 *V případě požadavku na vyjádření výsledku stanovení jako suma methioninu a hydroxyanalogu methioninu se sečtou výsledky stanovení methioninu (podle JPP ÚKZÚZ, postup č. 10021.1) a hydroxyanalogu methioninu (podle JPP ÚKZÚZ, postup 10330.1).*

## 7 Literatura

VD LUFA: Methodenbuch III, Method 4.11.4, 3. Ed., 1993.