

# STANOVENÍ IONOFOROVÝCH POLYETHEROVÝCH MONOKARBOXYLOVÝCH KYSELIN V KRMIVECH METODOU HPLC S POSTKOLONOVOU DERIVATIZACÍ

MICHAL DOUŠA

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno; Regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň  
hplc@seznam.cz

Došlo 7.2.03, přepracováno 8.3.04, přijato 17.4.04.

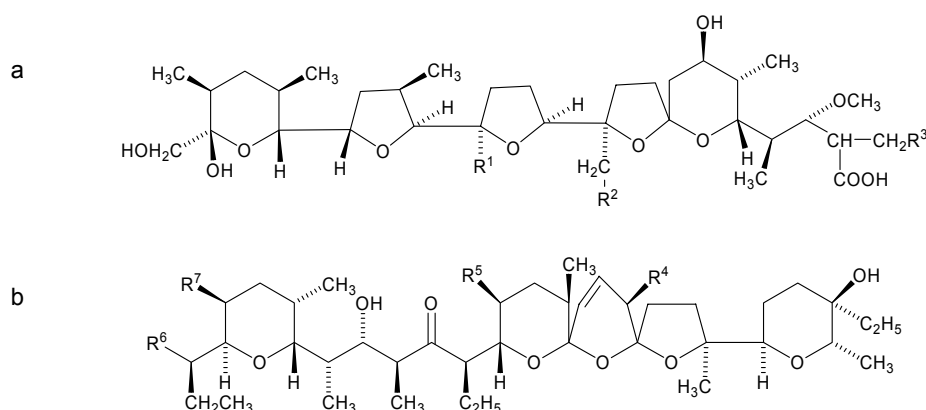
Klíčová slova: HPLC, monensin, salinomycin, narasin, krmivo

## Úvod

Mezi ionoforové polyetherové monokarboxylové kyseliny<sup>1</sup> patří monensin, salinomycin, narasin, lasalocid, semduramicin a maduramicin. Všechny se používají jako stimulatory růstu nebo antikokcidika ve výkrmu hospodářských zvířat, přičemž největší význam mají v současné době první tři jmenované. Monensin (obr. 1a) a jeho jednotlivé majoritní složky v antibiotickém komplexu byly izolovány ze *Streptomyces cinnamomensis*. Mikrobiologická aktivita monensinu B a C byla stanovena vzhledem ke složce monensinu A, které byla přiřazena aktivita 1000 µg monensinu na mg složky A. Salinomycin (obr. 1b) a jeho derivát narasin (obr. 1b), jehož čtyři majoritní složky (A, B, D, I) v antibiotickém komplexu byly izolovány ze

*Streptomyces aureofacies*, se používají jako stimulatory růstu ve výkrmu prasat resp. jako chemoterapeutika ve výkrmu kuřat, kuřic a krůt. Jejich antibiotické aktivity byly již popsány<sup>2</sup>.

Ke stanovení těchto antibiotik se používají zejména mikrobiologické metody, které však nejsou dostatečně selektivní a specifické. Stanovení se může provádět difúzní nebo turbidimetrickou metodou. Kline a spol. popsali metodu stanovení monensinu v premixech a krmných směsích<sup>3</sup>, která se používá jako oficiální metoda stanovení<sup>4</sup>. Byly rovněž popsány metody stanovení polyetherových antibiotik v krmivech pomocí tenkovrstvé chromatografie. K detekci se využívá především bioautografie nebo barevná reakce s vanilinem. Semikvantitativní metoda stanovení monensinu v krmivech metodou TLC byla popsána v roce 1983 (cit.<sup>5</sup>). Později byla popsána současná detekce monensinu, narasinu, salinomycinu a lasalocidu ve vzorcích krmiv a premixů na TLC desce s oxidem hlinitým<sup>6</sup>. Golab a spol. publikovali spektrofotometrickou metodu stanovení monensinu<sup>7</sup>, která je alternativou k mikrobiologickým metodám. Po extrakci monensinu methanolem se využívá jeho barevná reakce s 3% vanilinem (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) v prostředí 0,5% kyseliny sírové za vzniku intenzivně zbarveného produktu ( $\lambda_{\max} = 520$  nm). Barevná reakce vanilinu s vyššími alkoholy je obecně známa jako Komarowského reakce<sup>8</sup>, jejíž mechanismus byl popsán později<sup>9</sup>. Použití postkolonové derivatizace pro stanovení salinomycinu HPLC v krmivech navrhli v roce 1984 Goras a Lacourse<sup>10</sup>. Salinomycin se po extrakci hexanem analyzuje na normální silikagelové fázi s použitím mobilní fáze o složení ethylacetát – 2,2,4-trimethylpentan – kyselina octová – triethylamin (750:250:4:2). Jako postkolonové derivatizační činidlo byl použit vanilin s přidávkou kyseliny sírové. Z této práce vycházeli také Blanchflower a spol.<sup>11</sup>, kteří použili postkolonové derivatizace ke stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu v krmivech. K separaci použili reverzní fázi C18 a jako mobilní fázi směs methanol – voda – kyselina octová (940:59:1). Technika na reverzní fázi se pak stala nejpou-



Obr. 1. Strukturální vzorce monensinu (a) a salinomycinu a narasinu (b); monensin A (a, R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H); monensin B (a, R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H); monensin C (a, R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>); salinomycin (b, R<sup>4</sup> = OH, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = COOH, R<sup>7</sup> = H); narasin A (b, R<sup>4</sup> = OH, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = COOH, R<sup>7</sup> = CH<sub>3</sub>); narasin B (b, R<sup>4</sup> = O, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = COOH, R<sup>7</sup> = CH<sub>3</sub>); narasin D (b, R<sup>4</sup> = OH, R<sup>5</sup> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = COOH, R<sup>7</sup> = CH<sub>3</sub>); narasin I (b, R<sup>4</sup> = OH, R<sup>5</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup> = COOCH<sub>3</sub>, R<sup>7</sup> = CH<sub>3</sub>)

živanější metodou pro stanovení polyetherových antibiotik v premixech a krmivech<sup>12–15</sup>. Metoda HPLC byla v roce 1997 akceptována jako oficiální metoda AOAC (Association of Official Analytical Chemists) pro stanovení monensinu v krmivech<sup>16</sup>. Při stanovení HPLC s předkolonovou derivatizací se využívají reakce s 1-(bromacetyl)-pyrenem<sup>17</sup>, dansylchloridem<sup>18</sup> nebo 9-anthryldiazomethanem<sup>19</sup>. Jinou možností detekce polyetherových antibiotik je spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (LC-MS)<sup>20</sup> nebo použití refraktometrické detekce (RI)<sup>21</sup>.

K extrakci ionoforů ze vzorku se používá methanol<sup>11</sup>, aceton<sup>7</sup>, methanol-voda (90:10)<sup>14</sup> nebo hexan-ethylacetát (90:10)<sup>11,12</sup>. Žádný ze získaných extraktů nebyl dále přečišťován a byl použit přímo k analýze HPLC. Mez stanovitelnosti metod HPLC se pohybuje pro monensin od 0,25 do 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> a pro salinomycin a narasin 0,5–1,0 mg.kg<sup>-1</sup> a výtěžnost metody od 95 do 108 % (cit.<sup>11</sup>), od 92,1 do 103, % (cit.<sup>12</sup>) resp. od 97,5 do 103,3 % (cit.<sup>13</sup>).

K postkolonové derivatizaci ionoforů se využívá jako derivatizační činidlo 4-(dimethylamino)benzaldehyd s absorpčním maximem při 583–600 nm a vanilin s absorpčním maximem při 520–522 nm. Reakce probíhá v prostředí kyseliny sírové při teplotě 95 °C. Citlivost metody závisí na několika faktorech jako je teplota reaktoru<sup>10–12</sup>, průtok mobilní fáze a derivatizačního činidla, doba zdržení v reaktoru<sup>11,12,14</sup>, rozměry reakční kapiláry, koncentrace derivatizačního činidla<sup>11,12</sup> a vlnová délka.

V předkládané práci je věnována pozornost optimalizaci extrakce ionoforů, přečištění a zakoncentrování extraktu, HPLC stanovení, postkolonové derivatizace i detekce z hlediska vysoké robustnosti metody a její selektivity a snížení meze stanovitelnosti. Ke snížení meze stanovitelnosti jsme se pokusili nalézt i nová derivatizační činidla.

## Experimentální část

### Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Přečištění extraktu bylo provedeno na separační jednotce Baker SPE 12G System (J. T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Silica 500 mg (Waters, Milford, USA). Zakoncentrování a odstředění extraktu bylo provedeno na koncentrátoru vzorků Termovap (Ecom, Česká republika) a na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření se uskutečnila na kapalinovém chromatografu, který se skládal z vysokotlakého čerpadla W515, autosampleru W717 Plus Autosampler, spektrofotometrického detektoru W486 (vše Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Derivatizační smyčka RXN 1000 Coil Kit o celkovém vnitřním objemu 1000 ml byla umístěna do termostatu Column Temperature Control System (vše Waters, Milford, USA) a byla zařazena mezi chromatografickou kolonu NovaPak C18, 4 μm, 3,9 × 150 mm (Waters, Milford, USA) a detektor pomocí směšovací komůrky Mixer Cartridge 50 μl

(Supelco, USA). K postkolonové derivatizaci byla použita vysokotlaká pumpa W515 (Waters, Milford, USA).

### Chemikálie

Methanol, dichlormethan, a octová kyselina (vše čistoty pro HPLC, J. T. Baker, USA), ethylacetát, hexan p.a., kyselina sírová 98% chemicky čistá (Lachema Neratovice, Česká republika), ostatní chemikálie p.a. (Sigma-Aldrich, USA).

Extrakční směs byla připravena smísením 200 ml ethylacetátu a 800 ml hexanu. Promývací činidlo pro přečištění na kolonkách Sep-Pak Plus Silica bylo připraveno smísením 5 ml acetonu a 95 ml dichlormethanu. Eluční činidlo pro přečištění na kolonkách Sep-Pak Plus Silica bylo připraveno smísením 8 ml methanolu a 92 ml dichlormethanu. Mobilní fáze byla připravena smísením 75 ml 5% roztoku octové kyseliny a 925 ml methanolu. Ředící roztok byl připraven smísením 100 ml deionizované vody a 900 ml methanolu. Kalibrační roztoky o koncentraci 1,0; 2,0; 4,0 a 10,0 mg.l<sup>-1</sup> byly připraveny postupným ředěním směsného základního roztoku monensinu (Eli Lilly, USA), salinomycinu (Hoechst Roussel Vet, SRN) a narasinu (Eli Lilly, USA) v methanolu o koncentraci 200 mg.l<sup>-1</sup> ředícím roztokem. Derivatizační činidlo bylo připraveno smísením 100 ml methanolu a 15 ml konc. kyseliny sírové za chlazení, poté bylo v této směsi rozpuštěno 20,0 g 4-(dimethylamino)benzaldehydu (DMBA) a objem byl doplněn methanolem na 500 ml.

### V ý b ě r v z o r k ů

Pro analýzy byly použity reálné vzorky krmných směsí odebraných v rámci státního odborného dozoru, zákon o krmivech §16 a §17 (cit.<sup>22</sup>) a modelové vzorky krmiv o složení: 45 % pšenice, 15 % ječmen, 12 % sojový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % krevní šrot, 5 % úsušky picnin, 5 % pšeničné klíčky mačkané, 4 % vápenec a 1 % premix minerálních látek a vitamínů

Tabulka I  
Podmínky HPLC analýzy

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μm, 3,9 × 150 mm
Mobilní fáze	5% octová kyselina-methanol (75 : 925)
Průtok mobilní fáze	0,6 ml.min <sup>-1</sup>
Průtok derivatizačního činidla	0,8 ml.min <sup>-1</sup>
Objem derivatizační smyčky	1000 μl
Teplota derivatizační smyčky	90 ± 1 °C
Teplota kolony	38 °C
Objem nástřiku	50 μl
Detektor UV	598 nm

s přidavkem ionoforů 1,0; 2,0 a 5,0 mg.kg<sup>-1</sup>.

### Pracovní postup

Všechny vzorky se upravily homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku. 30 g zkušební vzorku se extrahovalo 100 ml extrakční směsí 30 min v 250 ml kónické baňce na laboratorní třepače. Na kolonku Sep-Pak Plus Silica, kondicionovanou 5 ml extrakční směsí, se odměřilo 10,0 ml přefiltrovaného extraktu. Kolonka se promyla třikrát 3 ml promývacího činidla a ionofory se eluovaly 8 ml elučního činidla do vialky na 10 ml. Eluát se odpařil pod proudem dusíku k suchu při teplotě 50 °C. Odparek se rozpustil v 1,0 ml ředícího roztoku, promíchal, vytemperoval na laboratorní teplotu, odstředil se 5 min při 10 000 ot.min<sup>-1</sup> a dávkoval se na chromatografickou kolonu. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

### Výsledky a diskuse

#### Optimalizace předběžné separace na tuhé fázi

K eluci interferentů na tuhé fázi kolonek Sep-Pak Plus Silica byl zvolen promývací systém dichlormethan-aceton (95:5). Desorpce ionoforů byla sledována na modelovém roztoku ionoforů v extrakčním roztoku při koncentraci, která odpovídala 4 mg.kg<sup>-1</sup> ionoforů ve finálním krmivu. Bylo zjištěno, že k desorpci ionoforů postačuje 6 ml elučního činidla, ale z důvodu dokonalé desorpce a proměnlivosti matrice byl zvolen objem 8 ml.

#### Optimalizace mobilní fáze a teploty při HPLC

Mobilní fáze byly optimalizovány tak, aby retenční faktor byl  $k \geq 1,0$ , rozlišení jednotlivých složek  $R_{1,2} \geq 1,5$  (a současně se rozděloval monensin A a monensin B), počet teoretických pater  $N \geq 5000$  a asymetrický faktor  $t_a \leq 1,3$  (obr. 2). V mobilní fázi byl sledován vliv koncentrace organického rozpouštědla na retenční faktor.

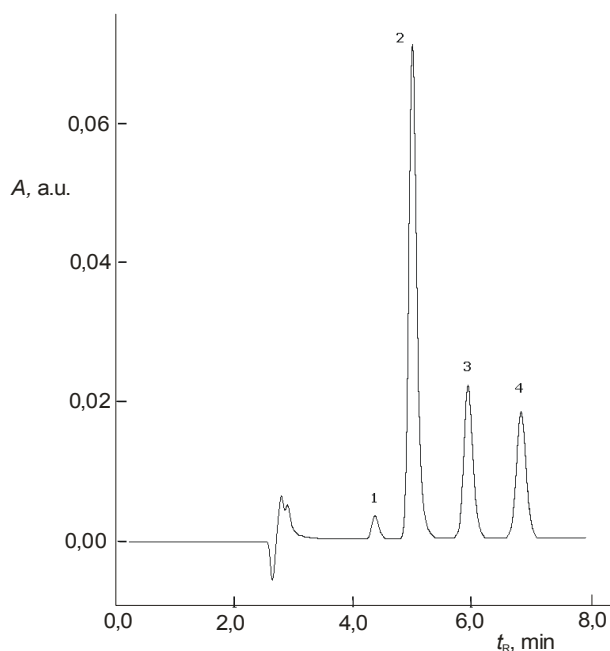
Vliv objemové frakce organického rozpouštědla  $\varphi$  v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky  $k$  lze popsat rovnicí<sup>23</sup>:

$$\log k = \log k_a - m\varphi \quad (1)$$

kde  $k_a$  je retenční faktor v čisté vodě jako mobilní fázi, získaný extrapolací experimentálních údajů a  $m$  je parametr přímo závislý na síle organického rozpouštědla a povaze solutu.

Rovnice (1) má (v rozmezí  $\varphi = 0,85$  až  $0,925$ ) tvar pro monensin A:  $\log k = 5,5612 - 6,0949\varphi$  ( $r = -0,9996$ ); pro salinomycin:  $\log k = 6,3315 - 6,7663\varphi$  ( $r = -0,9998$ ); pro narasin:  $\log k = 6,9589 - 7,3301\varphi$  ( $r = -0,9997$ ). Jako optimální mobilní fáze byla zvolena mobilní fáze o složení 5% octová kyselina-methanol (75 : 925), kdy se rozdělí všechny sledované ionofory a doba analýzy je 8 min.

Retence solutu s rostoucí teplotou klesá a  $\log k$  je lineární funkcí převrácené hodnoty teploty  $T$ . Tento závěr



Obr. 2. Separace monensinu, salinomycinu a narasinu na chromatografické koloně NovaPak C18; chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce I. 1 – monensin B, 2 – monensin A, 3 – salinomycin, 4 – narasin. Rozlišení  $R_{1,2} = 2,23$ ;  $R_{2,3} = 2,83$ ;  $R_{3,4} = 2,50$

odpovídá obecnému tvaru van't Hoffových závislostí pro chromatografický proces<sup>24,25</sup>:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M} = A + \frac{B}{T} \quad (2)$$

kde  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  jsou standardní entalpie a standardní entropie solutu v daném chromatografickém systému,  $V_S$  a  $V_M$  je objem stacionární resp. mobilní fáze,  $R$  je plynová konstanta a  $A, B$  jsou konstanty závislé na chromatografickém procesu. Pro teplotní rozsah 25 až 50 °C byly vypočteny konstanty pro monensin:  $A = -5,5265$ ,  $B = 1679,1$  ( $r = 0,9975$ ); pro salinomycin  $A = -4,0539$ ,  $B = 1323,6$  ( $r = 0,9920$ ) a pro narasin:  $A = -4,0895$ ,  $B = 1408,6$  ( $r = 0,9933$ ). Změnou teploty se nemění selektivita systému, rozlišení  $R_{1,2}$  i při teplotě 50 °C je větší než 1,75. Jako optimální teplota byla zvolena 40 °C.

#### Detekce

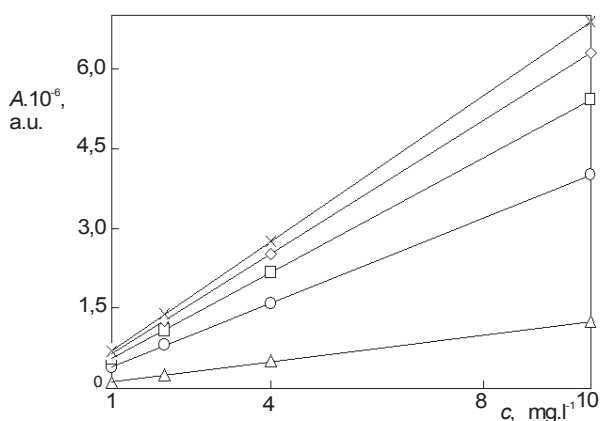
K detekci všech ionoforů byla zvolena vlnová délka 598 nm, která je absorpčním maximem vzniklého derivátu pro salinomycin a narasin. Pro monensin, který má absorpční maximum při 583 nm, je i při této vlnové délce detekce dostatečně citlivá.

Na dobu zdržení v průtokovém kapilárním reaktoru má vliv geometrie reaktoru a průtoky mobilní fáze a derivatizačního činidla. Protože byl použit komerčně dodaný průtokový kapilární reaktor o celkovém objemu 1000  $\mu$ l,

Tabulka II

Vliv objemového průtoku mobilní fáze a derivatizačního činidla na plochu píku (a.u.) monensinu A

Průtok mobilní fáze [ml.min <sup>-1</sup> ]	Průtok derivatizačního činidla [ml.min <sup>-1</sup> ]			
	0,6	0,8	1,0	1,2
0,6	4 160 857	4 189 615	3 943 947	3 690 341
0,8	2 267 044	2 505 589	2 574 759	2 543 162
1,0	1 204 908	1 468 855	1 626 362	1 694 876
1,2	661 336	879 505	1 040 029	1 141 780



Obr. 3. Vliv koncentrace kyseliny sírové v derivatizačním činidle na plochy píku monensinu A při konstantní koncentraci 4-(dimethylamino)benzaldehydu (30 g.l<sup>-1</sup>); koncentrace kyseliny sírové: Δ – 20 g.l<sup>-1</sup>, ○ – 40 g.l<sup>-1</sup>, □ – 60 g.l<sup>-1</sup>, ◇ – 80 g.l<sup>-1</sup>, × – 100 g.l<sup>-1</sup>

byla doba zdržení v reaktoru ovlivněna pouze změnou průtoku mobilní fáze a derivatizačního činidla. Byl sledován vliv průtoku mobilní fáze a derivatizačního činidla (pro průtoky 0,6; 0,8; 1,0 a 1,2 ml.min<sup>-1</sup>) na odezvu detektoru. Z výsledků měření byl jako optimální průtok vybrán průtok mobilní fáze 0,6 ml.min<sup>-1</sup> a derivatizačního činidla 0,8 ml.min<sup>-1</sup> (tabulka II; data jsou uvedena pro monensin, pro salinomycin a narasin jsou obdobná), kdy je odezva detektoru nejvyšší, což je v souladu se závěry práce<sup>14</sup>.

Dále byl sledován vliv koncentrace derivatizačního činidla a kyseliny sírové na plochu píku ionoforů a směrnici kalibrační přímky. Byla připravena derivatizační činidla o koncentraci 30 g.l<sup>-1</sup> DMBA s pěti různými koncentračními hladinami kyseliny sírové (20, 40, 60, 80 a 100 g.l<sup>-1</sup>) a byla sledována závislost plochy píku (pro čtyři koncentrační hladiny všech tří ionoforů; 1,0; 2,0; 4,0 a 10,0 mg.l<sup>-1</sup>) na koncentraci kyseliny sírové. Na obr. 3 je ukázán vliv koncentrace kyseliny sírové na plochu píku monensinu A. Závislost pro salinomycin a narasin je obdobná. Obdobným způsobem se postupovalo při sledování vlivu koncentrace DMBA při konstantní koncentraci kyseliny sírové

na plochy píku; bylo připraveno derivatizační činidlo o koncentraci 80 g.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> s pěti různými koncentračními hladinami DMBA (10, 20, 30, 40, 60 g.l<sup>-1</sup>) a bylo postupováno stejným způsobem jako při sledování vlivu koncentrace kyseliny sírové. Tvar závislosti plochy píku na koncentraci DMBA v derivatizačním činidle pro monensin A při konstantní koncentraci kyseliny sírové (80 g.l<sup>-1</sup>) je obdobný.

Z výsledků je patrné, že s rostoucí koncentrací obou činidel roste i směrnice kalibračních přímek. Na obr. 4 je ukázán vliv koncentrace kyseliny sírové na směrnici kalibračních přímek pro monensin A. Jako optimální se jeví koncentrace 40 g.l<sup>-1</sup> DMBA a 60 g.l<sup>-1</sup> kyseliny sírové.

#### Nová derivatizační činidla

Dosud byla použita k derivatizační reakci pouze dvě derivatizační činidla – vanilin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) a 4-(dimethylamino)benzaldehyd. K derivatizaci byly proto použity další aromatické aldehydy, které poskytují barevný produkt využitelný k detekci, a to salicylaldehyd (2-hydroxybenzaldehyd), thiofen-2-karbaldehyd, anisaldehyd (4-methoxybenzaldehyd), syringaldehyd (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd) a ethyl-

Tabulka III

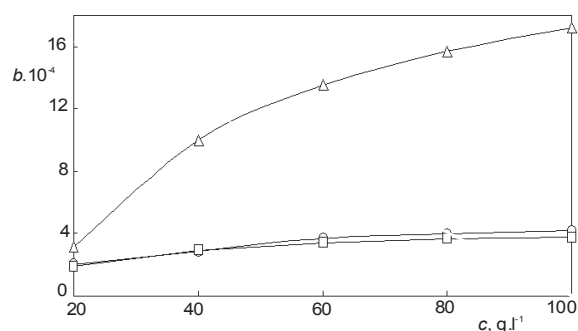
Absorpční maxima derivátů pro různá derivatizační činidla

Činidlo	Absorpční maximum [nm]		
	monensin	salinomycin	narasin
Salicylaldehyd	476	496	496
Thiofen-2-karbaldehyd	486	488	488
Syringaldehyd	534	538	538
Ethylvanilin	520	522	522
Vanilin	519	521	521
4-(Dimethylaminobenzaldehyd)	583	598	598
Anisaldehyd	492	495	495

Tabulka IV

Směrnice kalibračních přímk, meze detekce a meze stanovitelnosti pro různá derivatizační činidla

Činidlo	Monensin			Salinomycin			Narasin		
	$b^a$	$X_D^b$	$X_S^c$	$b^a$	$X_D^b$	$X_S^c$	$b^a$	$X_D^b$	$X_S^c$
Vanilin	151746	0,46	1,53	44684	0,3	1,00	43685	0,43	1,43
DMBA	153842	0,07	0,23	50061	0,1	0,33	48801	0,17	0,57
Ethylvanilin	148072	0,14	0,47	43793	0,09	0,30	42519	0,12	0,40
Ssyringaldehyd	142656	0,29	0,97	41387	0,12	0,40	40555	0,07	0,23
Thiofen-2-karbaldehyd	100220	0,18	0,60	24622	0,28	0,93	24195	0,1	0,33
Anisaldehyd	160567	0,13	0,43	43705	0,08	0,27	42423	0,09	0,30
Salicylaldehyd	72661	0,21	0,70	19480	0,89	2,97	18211	0,8	2,67

<sup>a</sup>  $b$  – směrnice kalibračních přímk (AU.s.l.mg<sup>-1</sup>), <sup>b</sup>  $X_D$  – mez detekce (mg.l<sup>-1</sup>), <sup>c</sup>  $X_S$  – mez stanovitelnosti (mg.l<sup>-1</sup>)

Obr. 4. Vliv koncentrace kyseliny sírové v derivatizačním činidle na směrnice kalibračních přímk monensinu A při konstantní koncentraci 4-(dimethylamino)benzaldehydu;

Δ – monensin, ○ – salinomycin, □ – narasin

Tabulka V

Výsledky testu přesnosti metody regresní rovnicí;  $a$  – konstantní soustavná chyba,  $b$  – proporcionální soustavná chyba,  $t_a$  a  $t_b$  jsou vypočtené hodnoty Studentova rozdělení

Parametry	Monensin	Salinomycin	Narasin
$a$	-0,1473	-0,6106	-0,001
$b$	1,00011	1,00348	0,99404
$t_a$	0,492	4,702	0,003
$t_b$	0,02	1,535	0,983

vanilin (4-hydroxy-3-ethoxybenzaldehyd). Absorpční maxima příslušných derivátů byla získána spektrofotometricky metodou zastaveného toku (tabulka III). Byly sestrojeny kalibrační přímk a vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti pro jednotlivé ionofory (tabulka IV). Jako nejvhodnější činidlo se jeví DMBA, které má nejvyšší citlivost, nejnižší mez stanovitelnosti a další výhodou je jeho poměrná stabilita v roztoku oproti ostatním derivatizačním činidlům. Z nových derivatizačních činidel se osvědčil anisaldehyd, který je v parametrech citlivosti a meze stanovitelnosti výhodnější než dosud používaný vanilin.

Koeficienty rovnice kalibračních přímk a meze detekce a meze stanovitelnosti vypočtené jako trojnásobek resp. desetinásobek šumu základní linie jsou uvedeny v tabulce IV. Kalibrační přímk jsou lineární při nástřiku 50  $\mu$ l v rozsahu 0,05–2,0  $\mu$ g.

## P ř e s n o s t a š h o d n o s t

Vzhledem k tomu, že nejsou dostupné certifikované referenční materiály, byla přesnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 $\times$ . Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti  $P=0,95$ ) jsou uvedeny v tabulce V. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 1,0 až 5,0 mg.kg<sup>-1</sup> je pro monensin (99,0  $\pm$  8,4) %, pro salinomycin (97,0  $\pm$  6,0) % a pro narasin (99,2  $\pm$  5,1) %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány lineární regresí. Konstanty  $a$  (konstantní soustavná odchylka) a konstanty  $b$  (proporcionální soustavná odchylka) regresního vztahu se neliší statisticky významně od nuly resp. jedničky (tabulka VI). Metoda tudíž poskytuje správné výsledky.

Shodnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpě-

Tabulka VI  
Parametry metody HPLC stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu

Statistické parametry	Stanovení látky								
	monensin			salinomycin			narasin		
Očekávaná hodnota, mg.kg <sup>-1</sup>	1,04	2,00	4,91	1,05	2,00	5,14	0,86	2,00	4,20
Nalezená hodnota, mg.kg <sup>-1</sup>	0,99	2,03	4,93	0,99	1,96	5,08	0,84	2,03	4,13
Výtěžek metody, %	95,2	101,5	100,4	94,0	98,0	98,8	97,8	101,5	98,3
Relativní směrodatná odchylka, %	1,28	2,84	0,48	1,62	2,21	1,56	2,70	3,08	0,60

tí obou paralelních stanovení reálných vzorků, jejichž celkový počet byl 50. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 0,2 až 5,0 mg.kg<sup>-1</sup> má opakovatelnost hodnotu 0,08 mg.kg<sup>-1</sup> pro monensin a 0,06 mg.kg<sup>-1</sup> pro salinomycin a narasin.

#### V ý p o č e t c e l k o v é h o o b s a h u m o n e n s i n u

Při separaci antibiotického komplexu monensinu na chromatografické koloně se rozdělí jeho dvě majoritní složky – monensin B a monensin A, přičemž složka B má 28 % biologické aktivity složky A. Koncentrace ostatních minoritních složek antibiotického komplexu monensinu i narasinu je zanedbatelná, a proto se s nimi při kvantifikaci nepočítá. Při výpočtu celkového obsahu monensinu se obsah monensinu B odečítá z kalibrační přímky pro monensin A a jeho obsah se přepočte na jeho biologickou

$$X = \frac{DV}{m}(c_A + c_{AB} \cdot 0,28) \quad (3)$$

aktivitu. Celkový obsah monensinu se pak vypočte součtem obsahů obou složek monensinu:

kde  $c_A$  je koncentrace složky monensinu A odečtená z kalibrační přímky v mg.l<sup>-1</sup>,  $c_{AB}$  je koncentrace složky monensinu B odečtená z kalibrační přímky pro monensin A v mg.l<sup>-1</sup>,  $D$  je ředění,  $V$  je objem extraktu vzorku v ml,  $m$  je hmotnost zkušebního vzorku v g a 0,28 je přepočítávací koeficient na biologickou účinnost monensinu B vzhledem k monensinu A.

#### Závěr

Byla vyvinuta HPLC metoda stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu v krmivech pro koncentrace řádově v  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Byla optimalizována předběžná separace, HPLC separace i detekce všech ionoforů. Byla zjištěna opakovatelnost metody na základě statistického vyhodnocení paralelních zkoušek na reálných vzorcích krmiv. Metoda je rychlá a celková doba analýzy je asi 90 min. Vzhle-

dem k postkolonové derivatizaci je tato metoda velmi selektivní a robustní a po mírných úpravách extrakce je použitelná i pro sledování průniku ionoforů do zvířecích tkání, tělních tekutin i výkalů.

#### LITERATURA

1. Pressman B. C., Fahim M.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 465 (1982).
2. Dorn P., Weber R., Weikel J., Wessling E.: *Prakt. Tierarzt* 64, 240 (1983).
3. Kline R. M., Striker R. E., Coffman J. D., Bikin H., Rathmacher R. P.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53, 49 (1970).
4. *Official Method of Analysis*, 15th Ed. AOAC, Arlington 1990.
5. Martinez E. E., Shimoda W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 66, 1506 (1983).
6. Owles P. J.: *Analyst* 109, 1331 (1984).
7. Golab T., Burton S. J., Scroggs R. E.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 56, 171 (1973).
8. Komarowski A.: *Chem. Ztg.* 27, 807, 1086(1903).
9. Duke F. R.: *Anal. Chem.* 19, 661 (1947).
10. Goras J. T., LaCourse W. R.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, 701 (1984).
11. Blanchflower W. J., Rice D. A., Hamilton J. T. G.: *Analyst* 110, 1283 (1985).
12. Lapointe M. R., Cohen H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 480 (1988).
13. Rodewald J. M., Moran J. W., Donoho A. L., Coleman M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75, 272 (1992).
14. Coleman M. R., Macy T. D., Moran J. W., Rodewald J. M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77, 1065 (1994).
15. Bridges D. A., Roth D. M., Cleveland C. M., Moran J. W., Coleman M. R.: *J. AOAC Int.* 79, 1255 (1996).
16. Coleman M. R., Moran J. W., Mowrey D. H.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 80, 693 (1997).
17. Asukabe H., Yoneyama H., Mori Y., Harada K., Suzuki M., Oka H.: *J. Chromatogr.* 396, 261 (1987).
18. Markantonatos A.: *J. Liq. Chromatogr.* 11, 877 (1985).
19. Martinez E. E., Shimoda W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69, 637 (1986).

20. Volmer D. A., Lock C. M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 157 (1998).
21. Dimenna G. P., Creegan J. A., Turnbull L. B., Wright G. J.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70, 504 (1987).
22. Zákon č. 91/1996 Sb. o krmivech ve znění pozdějších předpisů.
23. Berendsen G. E., Galan L.: *J. Chromatogr.* 196, 21 (1980).
24. Colin H., Guiochon G.: *J. Chromatogr.* 158, 183 (1978).
25. Jinno K., Ozaki N.: *J. Liq. Chromatogr.* 7, 877 (1984).

**M. Douša** (*Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture Brno, Regional Laboratory, Plzeň*):  
**Determination of Ionophoric Polyether Monocarboxylic Acids in Feedstuffs by HPLC with Post-Column Derivatization**

A fast HPLC method for determination of low contents of monensin, salinomycin and narasin in feedstuff was developed and validated. The ionophores were extracted from samples with a hexane – ethyl acetate mixture and, after purification on a Sep-Pak Silica column, they were determined by HPLC on C18 reverse phase using post-column derivatization with 4-(dimethylamino)benzaldehyde and UV detection at 598 nm. The pre-separation, separation and derivatization reaction of the ionophores were optimized. New derivatization reagents (salicylaldehyde, thiophene-2-carbaldehyde, 4-methoxybenzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde and ethylvanilin) were tested. For monensin, salinomycin and narasin, the respective parameters were as follows: determination limit 7.5, 266 and 503  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; repeatability 0.08 and 0.06  $\text{mg.kg}^{-1}$  (content 0.2–5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ); recovery 99.0  $\pm$  8.4, 97.0  $\pm$  6.0 and 99.2  $\pm$  5.1 % (content 1–5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ).