

Određivanje jonofornog kokcidiostatika salinomicina u premiksima i hrani za živinu tečnom hromatografijom posle post-kolonske derivatizacije

Ljiljana M. Kostadinović¹, Šandor M. Kormanjoš¹, Lazar N. Ružičić², Gordana K. Dozet²

¹Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad

²Megatrend univerzitet, Fakultet za biofarming, Bačka Topola

Izvod

U radu je razvijen i validiran postupak tečno-hromatografskog određivanja jonofornog kokcidiostatika salinomicina uz UV spektrofotometrijsku detekciju i post-kolonsku derivatizaciju dimetilaminobenzaldehidom (DMAB). Metoda je zasnovana na ekstrakciji salinomicina iz uzoraka hrane za životinje smešom acetonitril–voda (80:20, V/V) i prečišćavanju dobijenih ekstrakata na filteru 0.2µm Acrodisc® PSF. Relativna standardna devijacija za preciznost i obnovljivost je bila u opsegu od 2.4 do 8.8%, odnosno od 2.6 do 8.8%, a obnovljivost je bila u opsegu od 89 do 98%. Donja granica detekcije je iznosila 47 µg/kg, a donja granica kvantifikacije 71 µg/kg. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključuje se da je opisana metoda tačna, precizna, selektivna i reproduktivna i da se može primeniti za određivanje salinomicina u premiksima i hrani za živinu.

Ključne reči: salinomicin, tečna hromatografija, post-kolonska derivatizacija, validacija metode, hrana za živinu.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Intenzivna živinarska proizvodnja se prilagođava profilaksi kokcidioze na osobinama antikokcidijalnih preparata. Kokcidioza je visokoinvaziona parazitska bolest digestivnog trakta i stalan problem u živinarskoj proizvodnji. Izazivaju je protozoe iz roda *Eimeria* i *Iso-spora*. Novija antikokcidijalna sredstva širokog spektra delovanja su jonoforni polietarski kokcidiostatiki (antibiotici), koji se osim za suzbijanje kokcidioze, primenjuju i kao promotori rasta farmskih životinja, a dejstvo im se zasniva na sposobnosti prenošenja jona metala kroz biološke membrane ćelija kokcidija. Na taj način oni dovode do jonskog debalansa, prekida metabolizma parazita i izazivaju njihovo uginuće [1].

Salinomicin pripada grupi jednovalentnih polietarskih jonofornih antibiotika, metabolički je produkt plesni *Streptomyces albus*, koji poseduje mikrobiološku aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, plesnima i velikom broju virusa. Za prevenciju i kontrolu kokcidioze izazvanu kokcidijama iz roda *Eimeria*, najčešće se koriste jonoforni kokcidiostatiki, odnosno njihov najznačajniji predstavnik salinomicin. Salinomicin se u hranu za živinu dodaje u količini od 20–70 mg/kg. U ovoj količini salinomicin ima pozitivan efekat i na proizvodne rezultate tova, odnosno povećanje telesne mase, konverzije hrane i na bolje usvajanje hrane [2].

Za određivanje polietarskih jonofornih kokcidiostatika u premiksima i hrani za životinje najčešće se prime-

NAUČNI RAD

UDK 636.5.085.1:543.544.5

Hem. Ind. 68 (4) 445–448 (2014)

doi: 10.2298/HEMIND130513068K

njuje tečna hromatografija sa fluorescentnom [3,4] ili UV detekcijom [5–9]. Ove metode uključuju predkolonsku ili postkolonsku derivatizaciju ili ekstrakciju kolonskom hromatografijom, a obezbeđuju donju granicu detekcije od oko 1mg/kg, osim u slučaju lasalocida i narasina (0,5 mg/kg).

U radu su prikazani rezultati validacije tečno-hromatografske metode za određivanje salinomicina u uzorcima premiksa i hrane za brojere posle postkolonske derivatizacije, UV spektrofotometrijskom detekcijom. Opisana i validirana metoda može se primeniti i za određivanje ostalih jonofornih kokcidiostatika.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal

Sve hemikalije i rastvori koje su korišćene u radu, bile su analitičke čistoće za HPLC primenu.

Salinomicin u obliku natrijumove soli (SAL) (~98% čistoće) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Aditiv za hranu za životinje koji sadrži salinomicin-natrijum (Sacox® 120 microGranulate, Huvepharma, Edinburg, Škotska).

Acetonitril (ACN) i metanol (MeOH) (HPLC čistoće, Merck Sciences, Darmstadt, Nemačka), sulfatna kiselina, minimum 98% čistoće (VWR BDH Prolabo), dimetilaminobenzaldehid (DMAB), minimum 98% čistoće (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka).

Standardni rastvori

Osnovni standardni rastvor salinomicin-natrijuma, koncentracije 1mg/ml pripremljen je u metanolu i ko-

Preписка: Lj. Kostadinović, Univerzitet u Novom Sadu, Institut za prehrambene tehnologije, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Novi Sad, Srbija.

E-pošta: ljiljana.kostadinovic@fins.uns.ac.rs

Rad primljen: 13. maj, 2013

Rad prihvaćen: 5. septembar, 2013

rišćen je za izradu kalibracione krive sa 50, 100, 200 i 500 µg/ml.

Uzorci za analizu

Za određivanje obnovljivosti metode i efikasnosti ekstrakcije, primenjena je metoda standardnog dodatka. U komercijalne uzorke hrane, koji nisu sadržavali salinomicin dodata je tačno određena količina standardnog rastvora salinomicina, tako da se dobiju uzorci hrane sa koncentracijom salinomicina od 0.025, 0.05 i 0.1 mg/kg.

Metoda standardnog dodatka je primenjena i za dodavanje tačno određene količine aditiva Sacox® 120 u uzorke hrane (25.0±0.1 g uzorka), koji nisu sadržavali kokcidiostatik, tako da se dobiju uzorci hrane sa 15; 30 i 60 mg salinomicina/kg hrane za brojlere, odnosno uzorci sa trećinom, polovinom i profilaktičkom koncentracijom salinomicina.

Priprema uzoraka

Uzorak hrane (25.0±0.1g) se ekstrahuje sa 80 ml smeše acetonitril-voda (80:20, V/V), dok se pri analizi premiksa odmerava 5.00±0.1 g uzorka i ekstrakcija vrši sa 15 ml smeše. Uzorci se mučkaju 2 sata na vibracionoj mučkalici, dobijeni ekstrakt dekantuje, a ekstrakcija ponovi još dva puta sa istom zapreminom ekstrakcione smeše. Sakupljeni, spojeni ekstrakti se filtriraju kroz filter hartiju (Whatmann No. 1), potom uparavaju u struji azota skoro do suva na temperaturi od 45 °C. Ostatak se rastvori u 1 ml metanola i filtrira propuštanjem kroz 0.2 µm Acrodisc® PSF (Pall Europe Limited, UK) u vialice za automatsko injektovanje. Određivanje svake pojedinačne koncentracije vršeno je po šest puta.

Metoda

Uslovi tečno-hromatografskog određivanja

Sva određivanja su izvršena na hromatografu HPLC 1100 Agilent Technology (Diegm, Belgium) sa spektrofotometrijskim detektorom i reaktorom za postkolonsku derivatizaciju na 92 °C. Primenjena je kolona sa oktadecilsilanom na TSK-gelu: TSK ODS-120T, 10 µm (300 mm×7.8 mm) uz mobilnu fazu: MeOH–voda–sirćetna kiselina (94:6:0.1, V/V) iz koje je uklonjen ugljen dioksid, držanjem u ultrazvučnoj kadi. Injektivana zapremina je bila 100 µl, protok 0.7 ml/min, a UV detekcija je izvršena na 598 nm. Temperatura kolone je iznosila 38 °C.

Post-kolonska derivatizacija

Za post-kolonsku derivatizaciju mobilna faza se sastojala od 3% (V/V) sumporne kiseline 3% (V/V) DMAB. Protok je bio 0.9 ml/min, a temperatura reaktora 92 °C.

Koncentracija salinomicina u ispitivanim uzorcima je izračunata na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem koncentracije salinomicina u standardnim uzorcima.

Validacija metode

Validacija metode je izvršena određivanjem donje granice detekcije (DGD), donje granice kvantifikacije (DGK), preciznosti i obnovljivosti. Statistička obrada podataka je izvršena primenom komercijalnog softverskog paketa, Statistica®, verzija 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

REZULTATI I DISKUSIJA

Selektivnost

U radu je razvijen i validiran tečno-hromatografski postupak određivanja sadržaja salinomicina u uzorcima premiksa i hrane za živinu uz UV spektrofotometrijsku detekciju posle post-kolonske derivatizacije dimetilaminobenzaldehidom (DMAB). Postupak post-kolonske derivatizacije sa stvaranjem dobro detektabilnih derivata je bilo neophodno razviti, jer salinomicin ne sadrži hromoforne grupe i ne apsorbuje u UV oblasti. Primenom identičnih uslova tečno-hromatografskog određivanja uz post-kolonsku derivatizaciju, uspešno se razdvajaju i određuju i drugi jonoforni kokcidiostatiki: monensin i narasin. Retenciono vreme za monensin je 11.5 min, za salinomicin 13,5 min, a za narasin 15,5 min, čime je potvrđena selektivnost i specifičnost primenjene metode [10].

Osetljivost

Utvrđivanje donje granice detekcije (DGD) i donje granice kvantifikacije (DGK) je suštinsko pri validaciji metode i izračunato je na osnovu slepe probe ($n = 20$). Utvrđena DGDs (vrednost za slepu probu + 3SD) je 47 µg/kg, a DGKs (vrednost za slepu probu + 10SD) 71 µg/kg, što je dovoljno za osetljivo određivanje sadržaja salinomicina u uzorcima hrane za brojlere. Međutim, metoda tečno-hromatografskog određivanja uz UV detekciju nije dovoljno osetljiva, a samim tim ni primenjena za određivanje sadržaja eventualnih rezidua salinomicina i drugih jonofornih kokcidiostatika u jajima i tkivima tretiranih životinja. U ovu svrhu treba primeniti sistem tečna hromatografija–masena spektrometrija, koji obezbeđuje znatno nižu DGD i DGK za određivanje salinomicina (0,0017 i 0,012 mg/kg) [11].

Linearnost

Linearnost određivanja je ispitana na četiri koncentracije salinomicina: 50, 100, 200 i 500 µg/ml. Ponavljanje je vršeno svakog dana u toku validacionog postupka, a dobijena kalibraciona kriva predstavljena je kao zavisnost površine hromatografskih pikova od koncentracije standardnog rastvora salinomicina. Koeficijent linearnosti R^2 je bio 0,9995.

Preciznost

Preciznost primenjene metode je određena u više nezavisnih eksperimenata koji su sprovedeni istog

dana, na istom instrumentu, uz iste eksperimentalne uslove, određivanja je izvršio isti operater, a zatim su ponovljeni u više narednih dana. Analize su ponavljane tri dana, a u toku svakog dana eksperimenti su rađeni tri puta. U svakom pojedinačnom eksperimentu, injektovanje iste zapremine pripremljenog uzorka u tečno-hromatografski sistem rađeno je 6 puta, a rezultati su dobijeni kao srednja vrednost 6 pojedinačnih određivanja. Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da je metoda precizna i da se može primeniti za određivanje koncentracije salinomicina u uzorcima hrane za živinu.

Obnovljivost (*recovery*)

Validacija primenjene metode za određivanje Salinomicina u uzorcima hrane za živinu obuhvatila je ispitivanje obnovljivosti preko metode standardnog dodatka. Obnovljivost se kretala u opsegu od 89 do 98%, a rezultati su prikazani u tabeli 1. Nije utvrđen trend između obnovljivosti i koncentracije standardnog dodatka ili vrste hraniva. Utvrđeno je da je metoda obnovljiva, što se zaključuje i na osnovu prikazanih vrednosti srednje SD obnovljivosti.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja obnovljivosti tečno-hromatografskog određivanja sadržaja salinomicina u hrani za živinu
Table 1. Recovery test results of liquid-chromatographic determination of salinomycin in poultry feed

Uzorak	Dodato, mg/kg	Nađeno, mg/kg	Obnovljivost, %	RSD, %
Hrana+salinomicin	0,025	0,024	95	7,7
	0,050	0,049	98	7,0
	0,100	0,094	94	8,8
Hrana+Sacox® 120	15,0	13,4	89	2,4
	30,0	29,1	97	2,6
	60,0	54,0	90	2,8

ZAKLJUČAK

U ovom radu je opisana i validirana metoda tačne hromatografije uz spektrofotometrijsku UV detekciju i post-kolonsku derivatizaciju za određivanje sadržaja salinomicina u premiksima i hrani za živinu. Rezultati validacije pokazuju da je primenjena metoda selektivna, osetljiva, precizna i obnovljiva, te se može primeniti za kvantitativno određivanje sadržaja salinomicina u uzorcima hrane za živinu i premiksima, ako je njegov sadržaj viši od 71 µg/kg, koliko iznosi DGK metode. Metoda nije primenjiva za određivanje rezidua salinomicina u jajima i mesu tretiranih životinja. Opisana metoda se može primeniti za određivanje i drugih jonofornih kokcidiostatika.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koje je finansiralo ova istraživanja u okviru projekta III 46012.

LITERATURA

- [1] B.W.W. Braunius, Coccidiosis in Broilers: the Effective use of Anticoccidial drugs, *WPSJ* **38** (1982) 176–185.
- [2] V. Simić, M. Kapetanov, Lj. Kostadinović, S. Pavkov, R. Ratajac, S. Lazić, Mogućnost primene leka Sacox 120 u preveniranju kokcidioze živine, *Nauka u živinarstvu* **4** (1998) 473–477.
- [3] D.K. Matabudul, N. T. Crosby, I. Lumley, S. Sumara, The optimisation of rapid method for the determination of lasalocid in poultry feed using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography, *Food Chem.* **75** (2001) 465–471.
- [4] C. Focht, H. Campbell, J. Dalgleish, Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed phase liquid chromatography: collaborative study, *J AOAC Int.* **91** (2008) 479–488.
- [5] G. Dusi, V. Gamba, Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization, *J Chromatogr.* **835** (1999) 243–246.
- [6] A. Thalman, K. Wagner, M. Tomassen, J. Driessen, J. de Jong, Liquid chromatographic method to determine narasin in feedingstuffs and premixtures: development, validation and interlaboratory study, *J AOAC Int.* **87** (2004) 1278–1286.
- [7] J. de Jong, B. Stoisser, K. Wagner, M. Tomassen, J. Driessen, P. Hofmann, H. A. Putzka, Determination of maduramicin in feedingstuffs and premixtures by liquid chromatography: development, validation, and interlaboratory study, *J AOAC Int.* **87** (2004) 1033–1041.
- [8] H. Campbell, G. Nayeri, Determination of monensin, narasin, and salinomycin in mineral premixes, supplements, and animal feeds by liquid chromatography and post-column derivatization: collaborative study, *J. AOAC Int.* **89** (2006) 1229–1242.
- [9] G. Tavcar-Kalcher, K. Pavsic-Vrtac, A. Vengust, Validation of the procedure for the determination of maduramicin in concentrates, premixes and feeds by liquid chromatography, *Food Addit. Contam.* **22** (2008) 1–5.
- [10] W.J. Blanchflower, D.A. Rice, J.T.G. Hamilton, Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of monensin, narasin and salinomycin in feeds using post-column derivatisation, *Analyst* **110** (1985) 1283–1287.
- [11] M. Rokka, M. Jestoi, K. Peltonen, Trace level determination of polyether ionophores in feed, *Biomed Res. Int.* (2013,) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/151363>.

SUMMARY

DETERMINATION OF IONOPHORE COCCIDIOSTAT SALINOMYCINE IN PREMIXES AND POULTRY FEEDING STUFFS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AFTER POST-COLUMN DERIVATISATION

Ljiljana M. Kostadinović¹, Šandor M. Kormanjoš¹, Lazar N. Ružičić², Gordana K. Dozet²

¹University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad

²Megatrend University, Faculty of biofarming, Bačka Topola

(Scientific paper)

Coccidiosis is a common parasitic disease of broiler chickens caused by single-celled protozoan parasites of the genus *Eimeria*, which are commonly referred to as “coccidian”. This is an infective disease of the digestive tract which is most frequent among poultry, causing a decrease in daily increment, prolonged fattening, poorer skin pigmentation, slower feed conversion and increased mortality. The disease is caused by Protozoas from the genera of *Eimeria*, *Isospora* and *Cryptospora*, and it is manifested by damaging the intestine epithelial cells, less frequently the bile duct and reñaltubuli. Coccidiosis is traditionally controlled by chemotherapy. There are many anticoccidial preparations which are used in the prevention of coccidiosis. We chose a polyether monocarboxylic acid – salinomycine. Salinomycine consists monovalent carboxyl–polyether ionophores. Salinomycine, produced by *Streptomyces albus*, destroys the cell membranes and causes their lysis. Salinomycine and other ionophoric antibiotics combined with a number of mono and divalent cations and in the form of bi-complexes are capable to transfer metal ion through lipid hydrophobic membrane, and when they are added to diet, they change bioavailability, gut uptake and absorption and reserves of nutrient tissues. The validation process of liquid chromatography determination of ionophoric coccidiostat salinomycine with UV spectrophotometric detection and post-column derivatisation with dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) has been developed in this paper. The method is based on extraction of salinomycine in animal feed samples by using the mixture of acetonitrile and water (80:20, V/V) and by purification of extracts obtained by the filter 0.2 µm Acrodisc®PSF. The relative standard deviation (RSD) for reproducibility and accuracy varied from 2.4 to 8.8% and from 2.6 to 8.8%, respectively, and the values for the relative recovery rate ranged from 89 to 98%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were estimated to be below 47 and 71 µg/kg, respectively. Based on these results, it is concluded that the described method is accurate, precise, selective and reproducible and can be applied for determination of salinomycine in feeds and premixes for poultry.

Keywords: Salinomycine • Liquid chromatography • Post-column derivatisation • Method validation • Food for poultry