

STANOVENÍ HALOFUGINONU VE FINÁLNÍCH KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK METODOU HPLC

1. Definice

Halofuginon (trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-pyridyl)-acetyl]-4(3H)-chinazolidon hydrobromid) se stanoví po extrakci ze vzorku okyseleným naředěným vodným roztokem methanolu a po naředění metodou RP-HPLC s isokratickou elucí na koloně C₈ s UV detekcí při vlnové délce 243 nm.

2. Chemikálie a zkušební pomůcky

2.1 Methanol, HPLC grade

2.2 Kyselina octová, HPLC grade, čistota 100 %, CH₃COOH, $\rho = 1,05 \text{ g.cm}^{-3}$

2.3 Octan sodný trihydrát, CH₃COONa.3H₂O, M_r = 136,08 g/mol

2.4 Extrakční roztok pro premixy doplňkových látek: V odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 350 ml methanolu, 20 ml kyseliny octové a doplní vodou po značku a promíchá.

2.5 Mobilní fáze: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 250 ml methanolu, přidá se 1,36 g octanu sodného (2.3) a doplní vodou po značku. pH mobilní fáze se upraví kyselinou octovou (2.2) na hodnotu pH 5,0.

2.6 Halofuginon hydrobromid, základní látka, C₁₆H₁₈N₃O₃Br₂Cl, M_r = 495,6 g/mol

2.6.1 Halofuginon, základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží takové množství halofuginonu (2.6), aby výsledná koncentrace byla **0,08 mg/ml**, rozpustí se v asi 150 ml methanolu (2.1) na ultrazvukové lázni. Po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní methanolem (2.1) po značku a promíchá.

3. Pracovní postup

Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. ***Homogenizace a úprava vzorku se provádí, pokud je to možné, těsně před jeho zpracováním, aby se zabránilo ztrátám.*** Je nutné se vyhnout přímému slunečnímu světlu (pracovat při tlumeném světle).

3.1 Extrakce

3.1.1 Premixy doplňkových látek

Do odměrné baňky na 250 ml se zábrusem se naváží 5 g zkušebního vzorku, přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2.4), baňka se uzavře zátkou a třepe se 30 minut na laboratorní třepačce. Poté se baňka vloží na 5 minut do ultrazvukové lázně. Obsah baňky se nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Podle obsahu halofuginonu se extrakt naředí extrakčním roztokem (2.4) na koncentraci asi 4 – 10 mg/l.

3. 2 HPLC stanovení

3.2.1 Chromatografické podmínky

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se získaný extrakt podle čl. 3.1 filtruje přes membránový filtr 0,45 µm nebo se odstředí na laboratorní odstředivce 3 minuty při 10 000 ot./min. Na chromatografickou kolonu se nastřikuje objem 10 µl extraktu. Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona:	C18 - reverzní fáze, NovaPak 4 µm, 250x4,6 mm (Waters)
Mobilní fáze:	(2.5)
Průtok:	1,0 ml/min
Teplota kolony:	40 °C
UV-detektor:	243 nm
Objem nástřiku:	10 µl

3.2.2 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml základního roztoku halofuginonu (2.6.1), odměrné baňky se doplní extrakčním roztokem (2.4) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 1,6 - 3,2 - 6,4 a 16,0 mg/l halofuginonu. Kalibrační křivka se připravuje vždy čerstvá.

Pracovní roztoky halofuginonu se po ekvilibraci kolony (asi 10 kolonovými objemy) nanáší na chromatografickou kolonu (10 µl) a ze získaných průměrných ploch jim odpovídajícím píkům se sestrojí kalibrační křivka.

4. Výpočet

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

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

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

V objem extraktu v ml

R ředění

m_a hmotnost zkušebního vzorku v g