

## STANOVENÍ AMPROLIA METODOU HPLC V KRMIVECH A PREMI-XECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK

### 1. Definice

Amprolium je derivátem pyrimidinu. Stanoví se po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem methanol-voda (80+20) a přečištěním extrakcí na tuhé fázi Alumina A, metodou RP-HPLC s iontovými páry na reverzní fázi C<sub>18</sub> s UV detekcí při vlnové délce 270 nm.

### 2. Chemikálie a zkušební pomůcky

- 2.1 Acetonitril, HPLC grade
- 2.2 Kyselina fosforečná, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 98,0, ρ = 1,71 g.cm<sup>-3</sup>
- 2.3 Reagent iontových párů (1-HSA Na) - sodná sůl kyseliny hexansulfonové, M<sub>r</sub>=188,22 CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>SO<sub>3</sub>Na
- 2.4 Triethylamin, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N, M<sub>r</sub> = 101,19 /TEA/, čistota min. 99,5 %
- 2.5 Mobilní fáze: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří přesně 80 ml acetonitrilu (2.1), přidá se 1,42 g 1-HSA Na (2.3), 6 ml kyseliny fosforečné (2.2) a 6 ml triethylaminu (2.4), doplní vodou po značku a po vytemperování na laboratorní teplotu a promíchání se upraví pH roztoku triethylaminem (2.4) na hodnotu pH = 3,0.
- 2.6 Extrakční roztok premixy doplňkových látek: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 150 ml acetonitrilu (2.1), přidá se 5 ml kyseliny fosforečné (2.2) a 5 ml triethylaminu (2.4) doplní vodou a po vytemperování na laboratorní teplotu se objem doplní vodu po značku a promíchá.
- 2.7 Amprolium, M<sub>r</sub> = 315,25, C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>, např. Riedel-de Haën Cat.No. 46016
- 2.7.1 Amprolium, základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží asi 50 mg základní látky (2.8), přidá se asi 80 ml acetonitrilu(2.1) a po rozpuštění se doplní acetonitrem (2.1) po značku a promíchá. **1 ml** roztoku obsahuje asi **0,2 mg** amprolia
- 2.8 Kolona SPE, Alumina A Cartridges, např. Sep-Pak fa. Waters, Cat.No. WAT020500
- 2.9 Methanol HPLC grade
- 2.10 Extrakční roztok krmné směsi: methanol-voda v objemovém poměru 800+200

### 3. Pracovní postup

Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 1,0 mm a menší.

#### 3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se naváží - 5 g pro premixy doplňkových látek a 25 g pro krmné směsi. Přidá se 100,0 ml extrakčního roztoku (2.10), pro extrakci krmných směsí nebo 100,0 ml extrakčního roztoku (2.6) pro premixy doplňkových látek, baňka se uzavře zátkou a protřepává se na třepačce po dobu 30 minut. Potom se obsah baňky nechá sedimentovat a extrakt se filtruje přes hustý suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby.

### **3.1.1 Premixy doplňkových látek**

Extrakt pro premixy doplňkových látek, získaný podle čl. 3.1, se naředí na koncentraci asi 15 mg/l mobilní fázi (2.5).

### **3.1.2 Krmné směsi**

Pro krmné směsi je nutno extrakt před nástřikem na chromatografickou kolonu přechistit extrakcí na pevné fázi. Tato operace se provede připojením patrony Sep-Pak Alumina A (2.8) k extrakční jednotce, na patronu se nasadí injekční stříkačka objemu 5 ml a patrona se kondicionuje 5 ml methanolu. Poté se nanese 3,0 ml extraktu, získaného podle čl. 3.1 a extrakt se jímá do vialky na 10 ml, patrona se propláchne 3 krát 2 ml methanolu (2.1) a obsah se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 50 °C k suchu a odparek se rozpustí v 3,0 ml mobilní fáze (2.5) a rozpouští se 30 s na ultrazvukové lázni. Extrakt se odstředí 3 minuty při 8 000 ot/min a takto připravený extrakt se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu.

## **3.2 Kalibrace**

Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml základního roztoku amprolia (2.7.1), doplní mobilní fází (2.5) po značku a promíchá. Takto připravená sada odpovídá koncentracím 4,0 - 8,0 - 16,0 a 40,0 mg/l amprolia. Kalibrační roztok se nanáší na chromatografickou kolonu o objemu 20 µl. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestaví kalibrační křivka.

## **3.3 Chromatografické podmínky HPLC**

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona: SymmetryShield™ RP<sub>8</sub>, 4µm, 150x3,9 mm

Mobilní fáze: viz 2.6

Průtok: 0,8 ml/min

Teplota: okolí

UV-detektor: 270 nm

Objem nástřiku: 20 µl

RetTime: 4,1 min (pro uvedenou kolonu)

#### 4. Výpočet

Obsah amprolia (X) vyjádřený v mg.kg<sup>-1</sup> se vypočítá podle vzorce:

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

kde

- c** je koncentrace amprolia ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l
- V** objem extraktu v ml
- m<sub>a</sub>** hmotnost zkušebního vzorku v g
- R** ředění resp. zakoncentrování