

## STANOVENÍ OBSAHU AVILAMYCINU V PREMIXECH A KRMNÝCH SMĚSÍCH METODOU HPLC

### 1. Úvod

Avilamycin, , se stanoví po extrakci ze zkušebního vzorku chloroformem a přečištěním extraktu na pevné fázi Silica, na reverzní fázi C18 gradientovou elucí a UV detekcí při 295 nm.

### 2. Chemikálie a pomůcky

- 2.1 Chloroform,  $\text{CHCl}_3$ , p.a.
- 2.2 Acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , HPLC grade
- 2.3 Aceton, p.a.
- 2.4 Dichlormethan,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , p.a.
- 2.5 Methanol, p.a.
- 2.6 Octan sodný trihydrát,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $M_r = 136,08 \text{ g/mol}$
- 2.7 Promývací roztok SPE: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 75 ml acetonu (2.3), doplní dichlormethanem (2.4) po značku a promíchá.
- 2.8 Ředící roztok: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 200 ml vody ve které se rozpustí 1,36 g octanu sodného (2.6), přidá se 180 ml acetonitrilu a doplní vodou po značku a promíchá.
- 2.9 Mobilní fáze: **Solvent A:** acetonitril (2.2); **Solvent B:** V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí ve vodě 2,041 g octanu sodného (2.6), doplní vodou po značku a promíchá. pH takto připraveného roztoku se upraví na hodnotu pH 7,2 hydroxidem sodným (4 mol/l).
- 2.10 Avilamycin, základní substance,
- 2.11 Avilamycin, základní roztok: V odměrné baňce na 200 ml se rozpustí v methanolu (2.5) 0,0578 g avilamycinu (2.10), doplní methanolem po značku a promíchá.  
1 ml obsahuje mg složky B a mg složky A
- 2.12 Avilamycin, pracovní roztok: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 10,0 ml základního roztoku a doplní acetonem (2.3) po značku.  
1 ml obsahuje mg složky B a mg složky A
- 2.13 Kolonky Silica pro SPE, např. Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520

### 3. Pracovní postup

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 až 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a šrotování a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám avilamycinu.

#### 3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku, aby obsahoval asi 0,2 až 25 mg avilamycinu s přesností na 0,001 g (Tabulka č.1). Zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100,0 ml až 200,0 ml chloroformu (2.1), baňka se uzavře zátkou a třepě se na laboratorní třepačce 30 minut. Poté se nechá rozpouštět 1 minutu na ultrazvuku a následně se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml filtrátu se nepoužije.

#### 3.2 Vlastní stanovení

##### 3.2.1 Čistá látka, triturat a premixy doplňkových látek (obsah > 500 mg/kg)

Extrakt získaný podle čl. 3.1 se pipetuje takové množství, aby odpovídal koncentraci asi 10 mg/l, do odměrné baňky na 10 ml až 100 ml, odpaří se pod proudem dusíku k suchu a doplní ředícím roztokem (2.8) po značku, 1 minutu se rozpouští na ultrazvuku a promíchá. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 12 000 ot/min nebo se přefiltruje přes membránový filtr.

##### 3.2.2 Krmné směsi (obsah 2 - 500 mg/kg) - přečištění na pevné fázi - SPE Silica

Kolonky Silica se kondicionují 5 ml dichlormethanu (2.2) a na kolonku se nanese 1,0 až 10,0 ml extraktu podle deklarovaného obsahu avilamycinu získaného podle čl. 3.1. Extrakt se nechá vsáknout a promývá se 10 ml promývacího roztoku (2.7). Avilamycin se eluuje 10 ml acetonu (2.3) do vialek na 10 ml. Extrakt se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 50 °C do sucha a odparek se rozpustí v definovaném objemu ředícího roztoku (2.8) na ultrazvuku. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 5 minut při 12 000 ot/min nebo se přefiltruje přes membránový filtr.

### 3.3 Stanovení a kalibrace HPLC

Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje 1,0 - 2,0 - 5,0 a 10,0 ml pracovního roztoku avilamycinu (2.12), rozpouštědlo se odstraní odpařením pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Odparek se rozpustí na ultrazvuku v ředícím roztoku (2.8), doplní ředícím roztokem po značku a promíchají. Získá se sada kalibračních roztoků o koncentraci (mg/l):

Složka avilamycinu	1,0 ml	2,0 ml	5,0 ml	10,0 ml
Avilamycin B	0,263568	0,527136	1,317840	2,635680
Avilamycin A	1,736312	3,472624	8,681560	17,363120

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

Kolona: Symmetry C<sub>18</sub>, 5 µm, 150x3,9 mm

Mobilní fáze: Solvent A: acetonitril (2.1)

Solvent: mobilní fáze (2.9)

Gradientová tabulka:

#	Čas (min)	Průtok (ml)	%A	%B	Curve
1	0,0	1,0	35,0	65,0	
2	12,0	1,0	65,0	35,0	7
3	15,0	1,0	65,0	35,0	6
4	17,0	1,0	35,0	65,0	6
5	19,0	1,0	35,0	65,0	6

Teplota kolony: 38 °C

Objem nástřiku: 75 µl

Detektor UV: 295 nm

RunTime: 19 minut (pro uvedenou kolonu a teplotu)

RetTime : Avilamycin B: 7,1 minut

Avilamycin A: 9,4 minut

#### 4. Výpočet

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

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

kde  $c$  je koncentrace avilamycinu odečtená z kalibrační křivky v **mg/l**

$m_a$  hmotnost zkušebního vzorku v **g**

$V$  objem extraktu v **ml**

$R$  ředění, resp. zakoncentrování

$F$  faktor ředění  $F = m_a / V \cdot R$