

STANOVENÍ DIMETRIDAZOLU VE FINÁLNÍCH KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK METODOU HPLC

1. Definice

Dimetridazol se stanoví po extrakci ze vzorku směsným rozpouštědlem methanol-voda. Extrakt krmných směsí se přečistí na pevné fázi Alumina B, extrakt premixů doplňkových látek naředí a dimetridazol se stanoví metodou RP-HPLC na koloně C₁₈ s UV detekcí při vlnové délce 309 nm.

2. Chemikálie a zkušební pomůcky

2.1 Methanol, HPLC grade

2.2 Extrakční roztok: methanol (2.1) + voda (650+350, V+V)

2.3 Mobilní fáze, voda + methanol (2.1), (700+300, V+V)

2.4 Dimetridazol /DMD/, základní látka, C₅H₇N₃O₂, M_r = 141,1, Riedel-deHaën 46223

2.4.1 Dimetridazol, základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží asi 50 mg dimetridazolu (2.5), rozpustí v asi 180 ml methanolu (2.1) na ultrazvukové lázni a po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 mg DMT

2.5 Kolona SPE, Alumina B Cartridges, např. Sep-Pak, Waters Cat.No. WAT020505

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.

3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku, aby po extrakci a následným ředěním byla koncentrace dimetridazolu 4 až 40 mg/l - hmotnost a objem extrakčního činidla se volí podle tabulky č. 1. Navážka vzorku se přelije definovaným objemem extrakčního roztoku (2.2) a kónická baňka se uzavře zátkou se zábrusem, obsah se promíchá a extrahuje na laboratorní třepačce po dobu 60 minut. Poté se obsah baňky nechá ustát, a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije.

3.2 Krmné směsi - separace na pevné fázi Alumina B

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na pevné fázi. Kolonka alumina B (2.5) se připojí k polyethylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 3 ml extraktu získaného podle čl. 3.1. Na kolonku se nanese asi 1 ml extraktu a ta se nechá asi 5 sekund kondicio-

novat. Pak se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonkou, přičemž první podíl extraktu (0,1 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu (takto přečištěný extrakt je nutné promíchat).

3.3 Premixy doplňkových látek

Extrakt, získaný podle čl. 3.1 se naředí na požadovanou koncentraci extrakčním roztokem (2.2) na koncentraci asi 20 mg/l. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se získaný extrakt filtruje přes membránový filtr 0,45 µm nebo se odstředí na laboratorní odstředivce 3 minuty při 8000 ot./min. Na chromatografickou kolonu se nastříkuje objem 10 µl extraktu.

3.4 Chromatografické podmínky

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, 150x3,9 mm (Waters)
 Mobilní fáze A: methanol (2.1)
 Mobilní fáze B: voda-methanol (700+300, V+V)
 Průtok: 1,0 ml/min

Gradientová tabulka

	Time	Průtok	%A	%B	Křivka
1	0,00	1,00	0,0	100,0	6
2	9,00	1,00	0,0	100,0	6
3	10,00	1,00	100,0	0,0	6
4	16,00	1,00	100,0	0,0	6
5	17,00	1,00	0,0	100,0	6
6	26,00	1,00	0,0	100,0	6
7	27,00	1,00	100,0	0,0	6
8	57,00	1,00	100,0	0,0	6
9	58,00	0,00	100,0	0,0	6

Teplota: 38 °C nebo teplota okolí
 UV-detektor: 309 nm
 Objem nástřiku: 10 µl
 RetTime: asi 6,0 min (pro uvedenou kolonu a teplotu 38 °C)

3.5 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml základního roztoku dimetridazolu (2.4.1), odměrné baňky se doplní extrakční směsí (2.2) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 4,0 - 8,0 - 16,0 a 40,0 mg/l dimetridazolu.

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

4. Výpočet

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

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

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

V objem extraktu v ml

R ředění

m_a hmotnost zkušební vzorku v g