

STANOVENÍ ETHOPABÁTU V KRMNÝCH SMĚSÍCH A PREMIXECH METODOU HPLC

1. Definice

Ethopabate je po chemické stránce methylester 4-acetamido-2-ethoxybenzoové kyseliny a používá se v kombinaci s amproliem jako antikokcidikum. Stanoví se po extrakci methanolem a přečištění na alumině (SPE) metodou HPLC na reverzní fázi C₁₈ s fluorometrickou detekcí při vlnové délce 268 nm (excitační) a 350 nm (emisní).

2. Chemikálie a zkušební pomůcky

- 2.1 Methanol, HPLC grade
- 2.2 Acetonitril, HPLC grade
- 2.3 Kolona SPE, Alumina B Cartridges, (Sep-Pak, Waters Cat.No. WAT020505)
- 2.4 Mobilní fáze, voda + acetonitril (2.2) (700+300, V+V)
- 2.5 Ethopabát, C₁₂H₁₅NO₄, standardní substance, FLUKA, Cat.No. 00275
- 2.5.1 Ethopabát, základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 50,0 mg (nebo podle čistoty adekvátní množství) ethopabátu (2.5), rozpustí ve 100 ml methanolu (2.1) a po rozpuštění se doplní methanolem po značku a promíchá.
- 2.6 Extrakční roztok: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml vody, doplní methanolem (2.1) po značku a po vytemperování na laboratorní teplotu promíchá.

3. Pracovní postup

Při zpracování vzorku (mechanické úpravě) se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 1,0 mm a menší. Homogenizace a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo případným ztrátám ethopabátu.

3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží: 5 g pro premixy doplňkových látek a 25 g zkušebního vzorku pro krmné směsi. Přidá se 100,0 ml methanolu (2.1) pro extrakci krmných směsí nebo 100,0 ml extrakčního roztoku (2.6) pro premixy doplňkových látek, uzavře se zátkou a třepe se na laboratorní třepačce po dobu 30 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 Premixy doplňkových látek

Extrakt připravený podle čl. 3.1 se naředí methanolem (2.1) na požadovanou koncentraci asi 0,16 mg/l. Na chromatografickou kolonu se nastříkuje objem 5 µl naředěného extraktu.

3.3 Krmné směsi

Extrakt připravený podle čl. 3.1 se naředí methanolem (2.1) na požadovanou koncentraci (asi 0,16 mg/l). Takto naředěný extrakt se přečistí extrakcí na pevné fázi přes kolonu SPE Alumina B (2.3) tak, že se kolona alumina B (2.4) připojí k polyethylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 3 ml naředěného extraktu získaného podle prvního odstavce čl. 3.3 a na kolonu se protlačí pístem asi 1 ml extraktu a kolonka se nechá 5 sekund kondicionovat a pak se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonou. První podíl extraktu (0,1 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu (extrakt po separaci na tuhé fázi je nutné dokonale promíchat !). Před nástřikem na chromatografickou kolonu se takto získaný extrakt odstředí 5 minut na laboratorní odstředivce při 8000 ot/min. Na chromatografickou kolonu se nastříkuje objem 5 µl extraktu.

3.4 Stanovení metodou HPLC

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)

Eluční roztok: Voda-acetonitril (700+300, V+V)

Průtok: 1,0 ml/min

Teplota: okolí nebo 38 °C

FL-detektor: Excitační: 268 nm; Emisní: 350 nm

Objem nástřiku: 5 µl

RetTime: asi 3,5 min (pro uvedenou kolonu)

3.3 Kalibrace

Do odměrné baňky na **100 ml** se napipetuje **1,0 ml** základního roztoku ethopabátu (2.5.1), doplní methanolem (2.1) po značku a promíchá. takto se získá pracovní roztok o koncentraci **0,002 mg/l**. Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje **0,5 - 1,0 - 2,0 a 4,0 ml** pracovního roztoku ethopabátu, odměrné baňky se doplní methanolem (2.1) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci **0,04 - 0,08 - 0,16 a 0,32 mg/l**. Kalibrační roztoky ethopabá-

tu se po ekvilibraci kolony nastříkují na chromatografickou kolonu /5 µl / a ze získaných průměrných ploch jim odpovídajícím píkům se sestrojí kalibrační křivka.

4. Výpočet

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

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

kde c je koncentrace ethopabátu odečtená z kalibrační křivky v mg/l
 V objem extraktu v ml
 R ředění
 m_a hmotnost zkušebního vzorku v g