

## STANOVENÍ LASALOCIDU VE FINÁLNÍCH KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKCÍ

### 1. Definice a princip stanovení

Lasalocid je extrahován extrakčním směsným rozpouštědlem (pro obsah větší než 10 mg/kg) nebo směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý (pro obsah menší než 10 mg/kg); v případě obsahu menší než 10 mg/kg je extrakt je přečištěn na pevné fázi (silica) a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu mobilní fáze. Lasalocid je separován na chromatografické koloně s reverzní fází C<sub>18</sub> a detekován na fluorescenčním detektoru při excitační vlnové délce 310 nm a emisní vlnové délce 430 nm.

### 2. Chemikálie a zkušební pomůcky

- 2.1 Octan sodný trihydrát, CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O, M<sub>r</sub> = 136,08 g/mol
- 2.2 Kyselina octová, ρ = 1,05 g.cm<sup>-3</sup>, HPLC grade
- 2.3 Methanol, HPLC grade
- 2.4 Kyselina fosforečná, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 %, ρ = 1,71 g.cm<sup>-3</sup>
- 2.5 Octan ethylnatý, čistoty > 99,5 %, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 88,11 g/mol
- 2.6 Hexan, čistoty > 90 %, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, M<sub>r</sub> = 86,18 g/mol
- 2.7 Dichlormethan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 84,93, ρ = 1,32 g.cm<sup>-3</sup>
- 2.8 Extrakční roztok I: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml octanu ethylnatého (2.5), doplní n-hexanem (2.6) po značku a promíchá.
- 2.9 Extrakční roztok II: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 10 ml kyseliny fosforečné (2.4), přidá se 150 ml vody a doplní methanolem po značku a promíchá.
- 2.10 Pufr octanový: Do kádinky na 1 000 ml se naváží 3,402 g octanu sodného trihydrátu (2.1), přidá se 900 ml vody a 5,0 ml kyseliny octové (2.2), pod pH-metrem se upraví kyselinou fosforečnou (2.4) na pH = 4,0, převede se do odměrné baňky na 1000 ml, doplní vodou po značku a promíchá.
- 2.11 Mobilní fáze: V odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 200,0 ml pufru (2.10) a přidá methanol (2.3), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.
- 2.12 Lasalocid A, natriumsalz, C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>O<sub>8</sub>Na, M<sub>r</sub> = 612,78 g/mol, Riedel-deHaën, VETRANAL, Cat.No.46371, čistota min. 98 %

- 2.12.1 Základní roztok lasalocidu: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 0,0255 g standardní substance lasalocidu (2.12), doplní methanolem po značku a promíchá.

1 ml obsahuje 0,1 mg lasalocidu

- 2.13 Patrony Silica pro SPE, např. Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520

- 2.14 Eluční roztok pro SPE: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 50,0 ml methanolu (2.3), doplní dichlormethanem (2.7) po značku a promíchá

### 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 lasalocidu. Roztoky a extrakty lasalocidu se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.

#### 3.1 Extrakce

##### 3.1.1 Extrakce při obsahu lasalocidu > 10 mg/kg (krmné směsi a premixy)

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 1 až 20 mg lasalocidu s přesností na 0,001 g – 5 g pro tritúráty a premixy doplňkových látek, 25 g pro krmné směsi. Zkušební vzorek se přelije podle obsahu lasalocidu 100,0 ml až 200 ml extrakčního roztoku II (2.9; viz tabulka č.1, 2), baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

##### 3.1.2 Extrakce při obsahu lasalocidu < 10 mg/kg

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží 45 g zkušební vzorku. Zkušební vzorek se přelije 150,0 ml extrakční směsi I (2.8), baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

#### 3.2.1 Krmné směsi

Podle tabulky č. 1 se extrakt zkušební vzorku získaný podle čl. 3.1.1 naředí mobilní fází (2.11) na požadovanou výslednou koncentraci a před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 8000 ot/min.

Tab. č. 1 Ředění extraktu krmných směsí

Obsah (mg/kg)	Objem extrakčního činidla (ml)	Ředění R	Způsob ředění (ml/ml)	Faktor ředění F
od 10 do 50	100	1	-	0,25
od 50 do 150	100	2,5	10/25	0,1
od 150 do 300	100	5	5/25	0,05

### 3.2.2 Premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu lasalocidu se extrakt získaný podle čl. 3.1.1 naředění mobilní fází (2.11) na výslednou koncentraci asi 10 mg/l podle tab. č. 2.

Tab. č. 2. Ředění extraktu premixů doplňkových látek

Obsah (mg/kg)	Objem extrakčního činidla (ml)	Ředění R	Způsob ředění (ml/ml)	Faktor ředění F
od 300 do 1 000	100	5	5/25	0,01
od 1 000 do 5 000	100	25	1/25	0,002
od 5 000 do 10 000	100	50	1/50	0,001
od 10 000 do 20 000	200	50	1/50	0,0005
od 20 000 do 100 000	200	250	1/25 až 1/10	0,0001
od 100 000 do 150 000	250	625	1/25 až 1/25	0,000032
> 150 000	250	-	na koncentraci 10 mg/l	-

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 8000 ot/min.

### 3.2.3 Stanovení obsahu lasalocidu pro obsahy < 10 mg/kg

Na extrakční jednotku se nasadí patrona Silica pro SPE (2.13), kondicionuje se 5 ml extrakčního roztoku I (2.8) a poté se na patronu nanese 10,0 ml hexan-octan ethylnatého extraktu získaného podle čl. 3.1.2. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí patrony, promyje se 3krát 5 ml dichlormethanu (2.7) a poté se lasalocid eluuje do vialky na 10 ml 3krát 3 ml 10 % roztokem methanolu v dichlormethanu (2.14). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků pod proudem dusíku při teplotě 55 °C, odparek se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze (2.11), promíchá, rozpustí na ultrazvuku (30 s) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 8000 ot/min.

#### 4. Stanovení metodou HPLC

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

Kolona: Nova-Pak C<sub>18</sub>, 4 μm, 150x3,9 mm

Mobilní fáze: viz čl. 2.11

Průtok: 1 ml/min

Teplota: 38 °C

FL-detektor: EX: 310 nm EM: 430 nm

Časová konstanta: 0,5 s

Objem nástřiku: 5 μl

Retenční čas: 4,6 min (pro uvedenou kolonu a teplotu okolí)

Kapacitní poměr k': 2,3

Run Time: 14,0 min (pro uvedenou kolonu a teplotu okolí)

##### 4.1 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 4,0 ml základního roztoku lasalocidu (2.12.1), doplní mobilní fází (2.11) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci 2,0 - 4,0 - 8,0 a 16,0 mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 5 μl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

#### 5. Výpočet

Obsah lasalocidu (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 lasalocidu odečtená z kalibrační křivky v mg/l

m<sub>a</sub> hmotnost zkušebního vzorku v g

V objem extraktu v ml

R ředění, resp. zakoncentrování

F faktor ředění  $F = m_a / (C \cdot V)$