

STANOVENÍ OBSAHU METHYLBENZOCHÁTU METODOU HPLC V PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK A FINÁLNÍCH KRMIVECH

1. Účel a princip metody

Methylbenzochát je chemické stránce antikokcidikum o složení 2-methyl-7-benzyl-oxy-6-butyl-1,4-dihydro-4-oxychinolin-3-karboxylát.

Methylbenzochát se stanoví po extrakci vzorku horkým methanolem (premixy doplňkových látek) nebo horkým dichlormethanem (krmné směsi), po extrakci na pevné fázi Silica (krmné směsi), metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C_{18} s fluorescenční detekcí (excitační vlnová délka: 265 nm ; emisní vlnová délka: 390 nm). Metoda je použitelná pro obsahy od 0,1 mg/kg do 100 000 mg/kg.

2. Chemikálie

2.1 Methanol, HPLC grade

2.2 Dichlormethan, CH_2Cl_2 , $M_r = 84,93$, $\rho = 1,32 \text{ g.cm}^{-3}$

2.3 Extrakční roztok (80 % methanol): Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200,0 ml vody, přidá se 700 ml methanolu, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.

2.4 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , $M_r = 98,0$, $\rho = 1,71 \text{ g/ml}$

2.5 Mobilní fáze: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 280 ml vody, přidá se 1 ml kyseliny fosforečné (2.4), doplní methanolem (2.1) po značku a promíchá.

2.6 Methylbenzochát, základní substance (Rhône Mérieux), čistota: 96,9 %

2.7 Methylbenzochát, základní standardní roztok: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží podle deklarované čistoty 0,0206 g standardní substance methylbenzochátu (2.6) s přesností na 0,1 mg, rozpustí za tepla v methanolu (2.1), doplní po značku a promíchá

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje **0,02 mg** methylbenzochátu

2.8 Aceton; čistoty > 99,5 %, CH_3COCH_3 , $M_r = 58,1$

2.9 Promývací roztok dichlormethan-aceton (88+12): Do odměrné baňky na 200 ml se od-

měří 24 ml acetonu (2.8) a doplní se po značku dichlormethanem a promíchá.

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

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

3.1.1 Premixy doplňkových látek

Do kuželové baňky na 250 ml se naváží 1 až 5 g premixu doplňkových látek podle tabulky č. 1 a přidá se přesně 100,0 (nebo 200,0) ml extrakčního roztoku (2.3). Baňka se zváží s přesností na 0,01 g (hmotnost m_1) a poté se extrahuje při teplotě 65 – 70 °C na vodní lázni 30 minut pod zpětným chladičem a potom asi 5 minut na ultrazvukové lázni přičemž je nutno obsah během extrakce na vodní lázni několikrát ručně rozmíchat. Baňka se odstaví a ponechá v klidu, aby pevná část vzorku sedimentovala a vytemperovala na laboratorní teplotu, opět se zváží s přesností na 0,01 g a rozdíl hmotností se upraví methanolem na původní hmotnost (hmotnost m_1). Poté se obsah baňky filtruje do suché podložené nádoby suchým skládaným filtrem.

3.1.2 Krmné směsi pro obsah 0,1 až 100 mg/kg

Do kuželové baňky na 250 ml se naváží 20 g až 25 g krmné směsi podle tabulky č. 2 a přidá se přesně 100,0 ml dichlormethanu (2.2) Baňka se zváží s přesností na 0,01 g (hmotnost m_1) a poté se extrahuje při teplotě 45 °C na vodní lázni 30 minut pod zpětným chladičem a potom asi 5 minut na ultrazvukové lázni přičemž je nutno obsah během extrakce na vodní lázni několikrát ručně rozmíchat. Baňka se odstaví a ponechá v klidu, aby pevná část vzorku sedimentovala a vytemperovala na laboratorní teplotu, opět se zváží s přesností na 0,01 g a rozdíl hmotností se upraví dichlormethanem (2.2) na původní hmotnost (hmotnost m_1). Poté se obsah baňky filtruje do suché podložené nádoby suchým skládaným filtrem.

3.2 Vlastní stanovení

3.2.1 Premixy doplňkových látek

Z filtrátu extraktu zkoušeného vzorku, získaného podle čl. 3.1.1 se odpipetuje podle tabulky č. 1 příslušný objem V_1 do odměrné baňky o objemu V_2 a doplní mobilní fází po značku a 1 minutu se rozpouští na ultrazvukové lázni. Extrakt se odstředí 3 minuty při 8 000 ot./min a takto připravený extrakt se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu.

Tabulka č. 1 Ředění premixů doplňkových látek

Obsah [mg/kg]	Hmotnost zkušebního vzorku/ Objem extrakč- ního činidla [g/ml]	Ředění	Způsob ředění V_1/V_2 [ml/ml]
do 750	5,0/100	12,5	2/25
od 750 do 1 500	2,0/100	12,5	2/25
od 1 500 do 4 000	1,0/100	12,5	2/25
od 4 000 do 8 000	1,0/200	25	1/25
nad 8 000	1)	1)	1)

3.2.2 Krmné směsi pro obsah 0,1 až 100 mg/kg

Na extrakční jednotku se nasadí kolonka Silica pro SPE (2.10), kondicionuje se 5 ml dichlormethanu (2.2) a poté se na kolonku nanese 1 ml až 10,0 ml extraktu (získaného podle čl. 3.1.2) podle tabulky č. 2 (objem V_1). Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 3krát 5 ml dichlormethanu-aceton (2.9) a poté se kolonka nechá prosávat 25 minut vzduchem. Methylbenzochát se eluuje podle tabulky č. 2 do odměrné baňky na 2 ml až 10 ml mobilní fází (2.5) po značku (objem V_2). Obsah odměrné baňky se promíchá, rozpustí na ultrazvuku (30 s) a před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 10 000 ot./min.

¹ Hmotnost zkušebního vzorku se zvolí taková, aby koncentrace po extrakci byla výsledná koncentrace 50 mg/l, hmotnost zkušebního vzorku neklesla pod 0,5 g a po naředění byla koncentrace asi 2 mg/l.

Tabulka č. 2 Ředění krmných směsí pro obsah 0,1 až 100 mg/kg

Obsah [mg/kg]	Hmotnost zkušební vzorku/ Objem extrakčního činidla [g/ml]	Ředění	Způsob ředění V_1/V_2 [ml/ml]	Faktor ředění F
od 0,1 do 2	25/100	0,2	10/2	1,25
od 2 do 5	25/100	0,4	5/2	0,625
od 5 do 15	20/100	1	5/5	0,2
od 15 do 25	20/100	2,5	2/5	0,08
od 25 do 50	20/100	5	1/5	0,04
od 50 do 100	20/100	10	1/10	0,02

4. Kalibrace a chromatografické podmínky

Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje **0,5 - 1,0 - 2,0 a 4,0 ml** pracovního roztoku methylbenzochátu, doplní mobilní fází (2.5) po značku a promíchá. Takto připravená sada odpovídá koncentracím **0,4 - 0,8 - 1,6 a 3,2 mg/l** methylbenzochátu.

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

Kolona: C_{18} -reverzní fáze, Nova-Pak $C_{18},4$ mm, 150x3,9 mm

Mobilní fáze: viz čl. 2.5

Průtok: 1,0 ml/min

Teplota: okolí nebo 38 °C

FL detektor: EX: 265 nm EM: 390 nm

Objem nástřiku: 5 ml

RetTime: 4,5 min (pro uvedenou kolonu a teplotu 38 °C)

5. Výpočet

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

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

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

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

V objem extraktu v ***ml***

R ředění, resp. zakoncentrování