

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

1. Účel a princip metody

Meticlorpindol (clopidol, coyden) se stanoví se po extrakci vzorku horkým methanolem metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi C_{18} s UV detekcí při 265 nm. Metoda je použitelná pro obsahy od 15 mg/kg do 250 g/kg.

2. Chemikálie

2.1 Methanol, HPLC grade

2.2 Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 , $M_r = 136,091$

2.3 Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Na_2HPO_4 , $M_r = 177,99$

2.4 Meticlorpindol, $C_7H_7Cl_2NO$, $M_r = 192,06$, standardní substance o 100 % účinnosti

2.4.1 Meticlorpindol, základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 50 mg standardní substance meticlorpindolu (2.4) s přesností 0,1 mg, rozpustí v methanolu (2.1), doplní po značku a promíchá

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje **0,2 mg** meticlorpindolu

2.5 Mobilní fáze: Do odměrné baňky na 1000 ml se naváží 0,5051 g hydrogenfosforečnanu sodného (2.3) a 0,6018 g dihydrogenfosforečnanu draselného (2.2), rozpustí v asi 200 ml vody, přidá se 250 ml methanolu (2.1), doplní vodou po značku a promíchá. Roztok musí mít $pH = 6,7$.

2.6 Extrakční roztok I (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.

2.7 Extrakční roztok II (95 % methanol): Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 50,0 ml vody, přidá se 800 ml methanolu, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.

2.8 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 1,0 mm a menší.

3.1 Extrakce

Do kuželové baňky na 250 ml se naváží **25 g** krmné směsi a přidá se přesně **100,0 ml** extrakčního roztoku II (2.7) nebo **1 až 5 g** premixu doplňkových látek podle tabulky č. 1 a

přidá se přesně **100,0 ml** extrakčního roztoku I (2.6). Konečná koncentrace meticlorpindolu musí být nejvýše 400 mg/l a hmotnost zkušebního vzorku neklesla pod 0,5 g.

Premixy doplňkových látek se extrahují za tepla: kuželová baňka se zváží s přesností na 0,01 g (hmotnost m_1) a poté se extrahuje při teplotě 72 až 75 °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.

Krmné směsi se extrahují za studena: baňka se umístí na laboratorní třepačku a extrahuje se 30 minut, poté se extrahuje na ultrazvukové lázni 10 minut. Baňka se odstaví a ponechá v klidu, aby pevná část vzorku sedimentovala a poté se obsah baňky filtruje do suché podložené nádoby suchým skládaným filtrem.

3.2 Vlastní stanovení

3.2.1 Premixy doplňkových látek

Filtrát extraktu zkoušeného vzorku, získaný podle čl. 3.1 se ihned po filtraci extraktu, naředí mobilní fází na koncentraci 10 mg/l. Extrakt se odstředí 3 minuty při 9 000 ot./min a takto připravený extrakt se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu o objemu 10 µl .

3.2.2 Krmné směsi – separace na pevné fázi Alumina B

Kolonka Alumina B (2.8) se kondicionuje 4 ml extrakčního roztoku II (2.7). Poté se na kolonku podle obsahu meticlorpindolu nanese 1,0 až 5,0 ml extraktu (čl. 3.1) a obsah kolonky se eluuje do odměrné baňky na 10 ml extrakčním roztokem II (2.7) asi 1 cm pod značku. Obsah baňky se odfouká pod proudem dusíku při 55 °C na objem asi 0,5 ml. Odparek se rozpustí v mobilní fázi na ultrazvukové lázni (asi 1 minuta) a poté se odměrná baňka doplní mobilní fází (2.5) po značku. Obsah se promíchá, extrakt se odstředí 3 minuty při 9 000 ot./min a takto připravený extrakt se nanáší na chromatografickou kolonu o objemu 10 µl.

4. Kalibrace a chromatografické podmínky

Do sady odměrných baněk na **25 ml** se postupně pipetuje **0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml** základního roztoku meticlorpindolu (2.4.1), doplní mobilní fází (2.5) po značku a promíchá. Takto připravená sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci **4,0 - 8,0 - 16,0 a 40,0 mg/l** meticlorpindolu.

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

Kolona: C₁₈-reverzní fáze, Nova-Pak C₁₈, 4 μm, 150x3,9 mm

Průtok: 0,8 ml/min

Teplota: okolí nebo 38 °C

UV-detektor: 265 nm

Objem nástřiku: 10 μl

RetTime: 3,4 min (pro uvedenou kolonu a teplotu 38 °C)

5. Výpočet

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

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

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

m_a hmotnost zkušebního vzorku v **g**

V objem extraktu v **ml**

R ředění, resp. zakoncentrování