

STANOVENÍ NIFURSOLU VE FINÁLNÍCH KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK METODOU HPLC

1. Definice

Nifursol (3,5-dinitro-2'-(5-nitrofufuryliden)salicylohydrazid) se stanoví po extrakci ze vzorku tetrahydrofuranem resp. směsným rozpouštědlem tetrahydrofuran-acetonitril-voda. Po případném naředění extraktu se nifursol stanoví metodou RP-HPLC s isokratickou elucí na koloně C₁₈ s UV detekcí při vlnové délce 383 nm.

2. Chemikálie a zkušební pomůcky

2.1 Acetonitril, HPLC grade

2.2 Tetrahydrofuran, p.a.

2.3 Extrakční roztok: tetrahydrofuran (2.2) + acetonitril (2.1) + voda (400+200+400, V+V+V)

2.4 Trifluoroctová kyselina, HPLC grade, C₂HF₃O₂, M_r = 114,03 g/mol

2.5 Hydroxid sodný, roztok 10 mol/l

2.6 Mobilní fáze: Do kádinky na 1000 ml se odměří 380 ml acetonitrilu, přidá se 10 ml kyseliny trifluoroctové a 450 ml vody a pod pH metrem se upraví pH hydroxidem sodným na hodnotu 5,0. Poté se mobilní fáze převede do odměrné baňky na 1000 ml a doplní se po značku vodou.

2.7 Butylhydroxytoluen (BHT), C₁₅H₂₄O, M_r = 220,4 g/mol

2.8 Nifursol, základní látka, C₁₂H₇N₅O₉, M_r = 365,21 g/mol

2.8.1 Nifursol, základní roztok: Do odměrné baňky na 100 ml se naváží takové množství nifursolu (2.8), aby výsledná koncentrace byla 0,2 mg/ml, přidá se 50 mg BHT (2.7), rozpustí se v asi 80 ml tetrahydrofuranu (2.2) na ultrazvukové lázni. Po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní tetrahydrofuranem (2.2) po značku a promíchá.

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.*** Je nutné se vyhnout přímému slunečnímu světlu (pracovat při tlumeném světle).

3.1 Extrakce

3.1.1 Premixy doplňkových látek

Do odměrné baňky na 250 ml se zábrusem se naváží 2 g zkušebního vzorku, přidá se 150 ml tetrahydrofuranu (2.2), asi 100 mg butylhydroxytoluenu (2.7), baňka se uzavře zátkou a třepe se 30 minut na laboratorní třepačce. Poté se baňka vloží na 10 minut do ultrazvukové lázně. Pak se přidá 70 ml resp. 90 ml vody, vytemperuje na laboratorní teplotu a poté doplní vodou po značku. Obsah

baňky se nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Podle obsahu nifursolu se extrakt naředí extrakčním roztokem (2.3) na koncentraci asi 10 – 20 mg/l.

3.1.2 Krmné směsi

Do kónické baňky na 250 ml se naváží 20 g vzorku krmné směsi, 100 mg BHT (2.7), přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2.3) a třepe se na laboratorní třepačce 30 minut a pak se ještě rozpouští 10 minut na ultrazvuku. 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 HPLC stanovení

3.2.1 Chromatografické podmínky

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se získaný extrakt podle čl. 3.1 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. 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, 250x4,6 mm (Waters)
Mobilní fáze:	(2.6)
Průtok:	0,8 ml/min
Teplota kolony:	40 °C
UV-detektor:	383 nm
Objem nástřiku:	10 µl

3.2.2 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se postupně pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml základního roztoku nifursolu (2.8.1), odměrné baňky se doplní extrakční směsí (2.3) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 4,0 - 8,0 -16,0 a 40,0 mg/l nifursolu. Kalibrační křivka se připravuje vždy čerstvá.

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

4. Výpočet

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

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

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

V objem extraktu v ml

R ředění

m_a hmotnost zkušebního vzorku v g