

STANOVENÍ OLACHINDOXU METODOU HPLC V KRMIVECH A PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK

1. Definice

Olachindox jako chemická látka je hydroxyderivát chinoxalinu (N-1-hydroxyethyl)-3-methyl-2-chinoxalin-carboxamid-1,4-dioxid sumárního vzorce $C_{12}H_{13}N_2O_4$, $M_r = 249,24$.

2. Princip

Olachindox se extrahuje ze zkušební vzorku směsným rozpouštědlem aceton voda, extrakt se vyčechá Carrezovými činidly a přečistí se hexanem. V alikvotní části extraktu se stanoví olachindox metodou HPLC s UV-detekcí při vlnové délce 372 nm. Metodou se stanoví olachindox v krmivech i premixech od 3 mg/kg účinné látky.

3. Zkušební pomůcky a chemikálie

- 3.1 Aceton p.a.
- 3.2 Methanol, HPLC grade
- 3.3 Směsné rozpouštědlo aceton + voda, (900 + 100, V + V)
- 3.4 Carrezovo činidlo I: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží 219 g dihydrátu octanu zinečnatého, přidá se asi 500 ml vody a po rozpuštění se doplní po značku a promíchá.
- 3.5 Carrezovo činidlo II: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 106 g trihydrátu hexakyanoželeznatého draselného, přidá se 3 ml ledové kyseliny octové, doplní po značku a promíchá.
- 3.6 Hexan p.a.
- 3.7 Kyselina octová, HPLC grade, $c = 1 \%$: V odměrné baňce na 1000 ml se smísí 800 ml vody /HPLC grade/ a 9,5 ml kyseliny octové /HPLC grade, 100 %, $\rho = 1,05 \text{ g.cm}^{-3}$ /, vytemperuje na laboratorní teplotu, vodou se doplní po značku a promíchá.
- 3.8 Mobilní fáze: Kyselina octová (3.7) - methanol (3.2), (900 + 100, V + V)
- 3.9 Olachindox, standardní substance
- 3.9.1 Olachindox, základní roztok: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 50 mg olachindoxu (3.9) s přesností na 0,1 mg, rozpustí ve vodě, doplní po značku a promíchá. *Poznámka: Olachindox v roztoku je velmi fotolabilní.*

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,20 mg olachindoxu.

4. Pracovní postup

Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Vzorek se nemele, ale pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám olachindoxu. Roztoky olachindoxu se musí chránit před přímým slun-

nečným světlem a UV světlem (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření).

4.1 Extrakce

4.1.1 Krmné směsi

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku, aby obsahoval asi 0,2 mg olachindoxu s přesností na 0,001 g, 20 g pro krmné směsi. Zkušební vzorek se přelije 90 ml extrakční směsi (3.3), baňka se uzavře zátkou a 2 hodiny se intenzivně třepe na laboratorní třepačce. Potom se přidá pomalu 5 ml Carrezova činidla I (3.4) a pak 5 ml Carrezova činidla II (3.5), směs se promíchá a filtruje přes skládaný papírový filtr střední hustoty. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije.

50,0 ml čirého filtrátu se pipetuje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml a na rotačním vakuovém odpařováku za sníženého tlaku při teplotě maximálně 50 °C se odpaří na objem asi 5 ml.

Odparek se rozpustí ve 15 ml vody a převede se kvantitativně pomocí dalších 20 ml vody do dělicí nálevky na 250 ml, přidá se 50 ml hexanu (3.6). Dělicí nálevka se uzavře zátkou, protřepe se a po rozdělení fází se vodná fáze kvantitativně převede do druhé dělicí nálevky. Postup se opakuje s 50 ml hexanu (3.6), přičemž po rozdělení fází se vodní fáze odpustí do odměrné baňky na 50 ml. K odstranění zbytků hexanu se odměrná baňka krátce zahřeje na vodní lázni pod proudem dusíku při teplotě menší než 50 °C, baňka se ochladí na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá.

4.1.2 Premixy doplňkových látek

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku, aby obsahoval asi 10 mg olachindoxu s přesností na 0,001 g, pro premixy 5 g zkušebního vzorku. Zkušební vzorek se přelije 100,0 ml mobilní fáze (3.8), baňka se uzavře zátkou a 1 hodinu se intenzivně třepe na laboratorní třepačce. Extrakt se nechá ustát a pak se filtruje přes suchý hustý filtrační papír do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Podle deklarovaného obsahu olachindoxu se extrakt naředění vodou na výslednou koncentraci asi 20 mg/l.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (0,45 µm) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 2 minut při 8000 ot/min.

4.2 Stanovení metodou HPLC

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

<i>Kolona:</i>	<i>C₁₈-reverzní fáze, Nova-Pak C₁₈,4 mm, 150x3,9 mm</i>
<i>Průtok:</i>	<i>1 ml/min</i>
<i>Teplota:</i>	<i>38 °C</i>
<i>UV-detektor:</i>	<i>372 nm</i>
<i>Objem nástriku:</i>	<i>20 ml</i>
<i>Ret Time:</i>	<i>3,1 min (pro uvedené chromatografické podmínky)</i>
<i>Run Time:</i>	<i>8,0 min (pro uvedené chromatografické podmínky)</i>

4.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na **25 ml** se pipetuje **0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml** základního roztoku olachindoxu (3.9.1), doplní vodou po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci **4,0 - 8,0 - 16,0 a 40,0 mg/l**. Na chromatografickou kolonu se nanáší 20 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

5. Výpočet

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

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

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

m_a hmotnost zkušebního vzorku v g

V objem extraktu v ml

R ředění