

## STANOVENÍ ROBENIDINU METODOU HPLC (IPC) V PREMIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK A FINÁLNÍCH KRMIVECH

### 1. Definice a princip metody

Robenidin je kokcidiostatikum, po chemické stránce 1,3-bis-(p-chlorbenzylidenamino)-guanidin hydrochlorid. Stanoví se po extrakci vzorku okyseleným roztokem methanolu (kyselinou chlorovodíkovou), jeho přečištěním na pevné fázi (kyselé oxid hlinitý - SepPak Alumina A), metodou HPLC na reverzní fázi C<sub>18</sub> metodou iontové párové chromatografie s UV-detekcí při vlnové délce 314 nm.

### 2. Chemikálie a zkušební pomůcky

- 2.1 Acetonitril, HPLC grade
- 2.2 Methanol, HPLC grade
- 2.3 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná,  $\rho = 1,18 \text{ g.cm}^{-3}$
- 2.4 Extrakční roztok: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří asi 800 ml methanolu (2.2), přidá se 8 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (2.3), doplní methanolem po značku a promíchá.
- 2.5 Reagent iontových párů (1-HSA Na) - sodná sůl kyseliny hexansulfonové,  $M_r = 188,22$
- 2.6 Kyselina fosforečná ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), koncentrovaná 85 %,  $\rho = 1,71 \text{ g.cm}^{-3}$
- 2.7 Triethylamin, ( $\text{C}_2\text{H}_5$ )<sub>3</sub>
- 2.8 Mobilní fáze: V odměrné baňce na 1000 ml se ve 300 ml methanolu (2.2) a 300 ml acetonitrilu rozpustí 0,9411 g sodné soli kyseliny hexansulfonové (2.5), přidá se 5 ml kyseliny fosforečné (2.6) a 5 ml triethylaminu (2.7), doplní vodou po značku a promíchá.
- 2.9 Robenidin, základní látka 96 % min., Röthel GmbH, SRN
  - 2.9.1 Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 0,0521 g robenidinu (2.9), rozpustí se v methanolu (2.2) a po rozpuštění (ultrazvuk) se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.

**1 ml roztoku obsahuje 0,2 mg robenidinu.**
- 2.10 Kolona SPE, Alumina A Cartridges, např. Sep-Pak fa. Waters, Cat.No. WAT020500

### 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 těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám robenidinu. Roztoky robenidinu se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření). Extrakt vzorku se musí zpracovat nejdéle do 24 hodin po jeho přípravě.

### 3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se naváží **25 g** zkušebního vzorku krmné směsi, přidá se přesně **100,0 ml** extrakčního roztoku (2.4), nebo **6 g** zkušebního vzorku premixu doplňkových látek, přidá se **150,0 ml** extrakčního roztoku (2.4). Baňka se uzavře zátkou a třepe 30 minut na laboratorní třepačce a následně se rozpouští 5 minut na ultrazvukové lázni. Potom se obsah v baňce nechá usadit a filtruje se suchým hustým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

#### 3.1.1 Premixy doplňkových látek

Premixy doplňkových látek se naředí na požadovanou koncentraci kalibrační přímky (10 mg/l) mobilní fází (2.8). Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt filtruje membránovým filtrem (0,45 µm) nebo se odstředí 3 minuty při 8000 ot/min.

#### 3.1.2 Krmné směsi

Pro krmné směsi je nutno extrakt před nástřikem na chromatografickou kolonu přechistit extrakcí na tuhé fázi. Tato operace se provede připojením kolonky Sep-Pak Alumina A (2.10) k extrakční jednotce, na kolonku se nasadí injekční stříkačka objemu 5 ml a patrona se kondicionuje 5 ml methanolu. Poté se nanese 2,0 ml extraktu, získaného podle čl. 3.1 a extrakt se jímá do odpařovací baňky nebo vialky na 10 ml, kolonka se propláchne 3 krát 3 ml methanolu (2.2) a obsah baňky se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 50 °C nebo na rotačním vakuovém odpařováku k suchu a odparek se rozpustí 30 s v 2,0 ml mobilní fáze (2.8) na ultrazvukové lázni. Extrakt se odstředí 3 minuty při 8 000 ot/min a takto připravený extrakt se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu.

## 4. Kalibrace a separační podmínky HPLC

Do sady odměrných baněk na **25 ml** se pipetuje postupně **0,5 - 1,0 - 2,0 a 5,0 ml** základního roztoku robenidinu (2.9.1), doplní se mobilní fází (2.8) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá obsahu robenidinu **4,0 - 8,0 - 16,0 a 40 mg/l**. Takto připravené

roztoky se nanášejí na kolonu HPLC a průměrné hodnoty jim odpovídajících ploch píků slouží k sestrojení kalibrační křivky.

#### Separační podmínky HPLC:

Kolona: Symmetry C<sub>18</sub>, 5μm, 150 x 3,9 mm

Průtok: 1,0 ml/min

UV-detektor: 314 nm

Objem nástřiku: 10 μl

Teplota: 38 °C

RetTime: asi 5,0 min (pro uvedenou kolonu)

RunTime: 8 minut (pro uvedenou kolonu)

#### 4. Výpočet

Obsah robenidinu (X) vyjádřený v mg.kg<sup>-1</sup> se vypočítá podle vzorce:

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

kde **c** je koncentrace amprolia ve zkušebním vzorku, zjištěná pomocí z kalibračního grafu v **mg/l**

**V** objem extraktu v **ml**

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

**R** ředění