	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10370.1 – Stanovení obsahu dekochinátu metodou HPLC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU DEKOCHINÁTU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dekochinátu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení obsahu dekochinátu v kompletních krmných směsích, doplňkových krmných směsích a premixech.

2 Princip

Dekochinát se extrahuje ze vzorků roztokem 1% chloridu vápenatého v methanolu na mechanické třepačce nebo míchačce po dobu 60 min. Po odstředění nebo filtraci následuje analýza na HPLC s reverzní fází a detekce fluorescenčním detektorem.

Mez stanovitelnosti metody závisí na matici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

Poznámky

1 *Pozitivní hladiny analytu ve vzorcích by měly být potvrzeny analýzou na HPLC s použitím alternativní vlnové délky excitace.*

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Methanol HPLC grade.

2 Methanol.

3 Chlorid vápenatý bezvodý nebo dihydrát chloridu vápenatého.

4 HPLC ředící roztok.


Příprava: Rozpustí se vápenatá sůl (3) - ekvivalentně 10 g bezvodého chloridu vápenatého v methanolu (1). Dobře se promíchá a doplní se na objem 1000 ml.

5 Extrakční činidlo.

Příprava: Rozpustí se vápenatá sůl (3) - ekvivalentně 10 g bezvodého chloridu vápenatého v methanolu (2). Dobře se promíchá a doplní na objem 1000 ml.

6 Referenční standard dekochinátu.

Čistý referenční standard např. od firmy Alpharma. Čistota musí být uvedena v certifikátu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10370.1 – Stanovení obsahu dekochinátu metodou HPLC	Revize	1

Standardní roztok dekochinátu, cca 300 µg/ml.

Příprava: Naváží se 30 mg referenčního standardu dekochinátu (6) s přesností 0,1 mg a rozpustí se v ředicím roztoku (4). Po rozpuštění se převede do 100ml odměrné baňky a doplní se po značku. K rozpuštění se může použít ultrazvuková lázeň.

Pracovní standardní roztok, cca 6 µg/ml.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetují 2 ml standardního roztoku dekochinátu a doplní se po značku ředicím roztokem (4). Před každou sérií analýz vzorků se tento roztok kontroluje. Absorbance standardního roztoku dekochinátu naměřená při 265 nm proti ředicímu roztoku (4) má být v rozsahu 0,672 až 0,728.

Kalibrační standardní roztoky, cca (0,15; 0,30; 0,60; 1,2) µg/ml.

Příprava: Podle tabulky 1 se pipetují uvedená množství pracovního standardního roztoku do uvedených odměrných baněk, které se doplní po značku ředicím roztokem (4).

Tabulka 1.

Standard	Objem pipetovaného pracovního roztoku (ml)	Objem odměrné baňky (ml)	Ředicí factor	Přibližná koncentrace (µg/ml)
A	5	200	40	0,15
B	5	100	20	0,30
C	10	100	10	0,60
D	10	50	5	1,20

7 Mobilní fáze.

Příprava: Rozpustí se vápenatá sůl (3) - ekvivalentně 10 g bezvodého chloridu vápenatého ve směsi methanol/voda (8). Před použitím se zfiltruje pomocí vakua (2).

8 Směs methanol : voda, 825 : 175 (v/v).

Příprava: Smíchá se 825 ml methanolu (1) a 175 ml vody (10).

9 Roztok pro vymývání kolony.


Příprava: Smíchá se 85 ml methanolu (1) a 15 ml vody (10). Kolona se vymývá po skončení analýz.

10 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

Poznámky

2 *Použitelnost standardního roztoku dekochinátu je 1 měsíc. Skladuje se ve tmě při teplotě 0 °C až 10 °C.*

3 *Všechny pracovní roztoky dekochinátu se musejí připravovat čerstvě.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10370.1 – Stanovení obsahu dekochinátu metodou HPLC	Revize	1

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka.
- 2 Filtrační zařízení pro filtr 0,45 µm.
- 3 Odstředivka s tubami (50 ml).
- 4 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s fluorescenčním detektorem a kolonou C18, např. C18 ACE, Luna, Waters: 5 µm, (4,6 × 250) mm.

5 Postup

5.1 Krmné směsi s obsahem dekochinátu (10 – 500) mg/kg

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží 10 g krmiva s přesností 0.1 g. Přidá se 100 ml extrakčního činidla (5). Baňka se umístí na třepačku nebo míchačku (1) a třepe se nebo míchá po dobu 1 h. Vzorek se pro usazení pevných částic nechá stát cca 10 min. K analýze se bere čistý alikvotní podíl. Pokud je extrakt zakalený, převede se nejméně 40 ml extraktu do 50ml centrifugační tuby a odstředí. Čistý extrakt se naředí ředicím roztokem (4) tak, aby se koncentrace pohybovala v rozmezí (0,3 – 0,6) µg/ml. Zředěný roztok se zfiltruje přes membránový filtr (2). Následně se roztok analyzuje na HPLC systému (4).

Poznámky


- 4 *Při extrakci mléčných krmných směsí je nutná zvýšená pozornost při přidávání extrakčního činidla. Mohou se vytvořit menší či větší shluky krmiva, čímž dochází k obdržení nižších výsledků. Extrakční činidlo je třeba přidávat po malých dávkách za současného promíchání. Pokud se vytvoří shluky krmiva, k rozpuštění je vhodné použít ultrazvukovou lázeň po dobu 5 min.*

5.2 Premixy a doplňková krmiva s obsahem dekochinátu nad 500 mg/kg

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží 0,5 g až 2 g vzorku dle deklarované hodnoty s přesností 0,01 g. Přidá se 100 ml extrakčního činidla (5). Baňka se umístí na třepačku nebo míchačku (1) a třepe se nebo míchá po dobu 1 h. Vzorek se nechá stát cca 10 min pro usazení pevných částic. K analýze se bere čistý alikvotní podíl. Pokud bude extrakt zakalený, převede se nejméně 40 ml extraktu do 50ml centrifugační tuby a odstředí. Čistý extrakt se naředí ředicím roztokem (4) tak, aby se koncentrace pohybovala v rozmezí (0,3 – 0,6) µg/ml. Zředěný roztok se zfiltruje přes membránový filtr (2). Následně se roztok analyzuje na HPLC systému (4).

Poznámky

- 5 *Pro koncentraci dekochinátu 1000 mg/kg se navažují 2 g zkušební vzorku a ředí 1 ml čistého extraktu do 100ml odměrné baňky. Pro doplňková krmiva s obsahem dekochinátu 6 % se navažuje 0,5 g zkušební vzorku a ředí v poměru 1/400.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10370.1 – Stanovení obsahu dekochinátu metodou HPLC	Revize	1

5.3 Stopová analýza krmiv s obsahem dekochinátu pod 10 mg/kg

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží 10 g krmiva s přesností 0,1 g. Přidá se 100 ml extrakčního činidla (5). Baňka se umístí na třepačku nebo míchačku (1) a třepe se nebo míchá po dobu 1 h. Vzorek se nechá stát cca 10 min pro usazení pevných částic. K analýze se bere čistý alikvotní podíl. Pokud je extrakt zakalený, převede se nejméně 40 ml extraktu do 50ml centrifugační tuby a odstředí. Čistý extrakt se naředí ředicím roztokem (4) tak, aby se koncentrace pohybovala v rozmezí (0,3 – 0,6) µg/ml. Zředěný roztok se zfiltruje přes membránový filtr (2). Následně se roztok analyzuje na HPLC systému (4).

5.4 Kontrola kvality - metoda standardního přídatku

Do tmavé Erlenmayerovy baňky se naváží 10 g krmiva, které neobsahuje dekochinát, s přesností 0,1 g.

K navážce se přidá 1 ml standardního roztoku dekochinátu (6) o koncentraci 300 µg/ml a nechá se stát 15 min. Poté se přidá 100 ml extrakčního činidla (5). Dále se postupuje podle 5.1. Výtěžnost analytu se musí pohybovat v rozmezí (80 – 110) %. Tímto postupem se získá krmivo s obsahem dekochinátu 30 mg/kg.

K navážce se přidá 15 ml pracovního roztoku dekochinátu (6) o koncentraci 6 µg/ml a nechá stát 15 min. Poté se přidá 85 ml extrakčního činidla (5). Dále se postupuje podle 5.1. Výtěžnost analytu se musí pohybovat v rozmezí (70 – 110) %. Tímto postupem se získá krmivo s obsahem dekochinátu 9 mg/kg.

5.5 Stanovení metodou HPLC


Uvedené parametry HPLC jsou pouze orientační.

Tabulka 2. Parametry HPLC.

Kolona	Analytická kolona ACE C18: 5 µm, (4,6 × 250) mm
Teplota kolony	Laboratorní teplota nebo 30 °C
Mobilní fáze	(7)
Objem nástřiku	20 µl
Průtok	0,5 ml/min
Excitační vlnová délka	330 nm
Emisní vlnová délka	390 nm

Při dodržení těchto HPLC podmínek je retenční čas dekochinátu 14 min až 17 min, kapacitní faktor 5.

Po dokončení analýz se systém vyčistí vymývacím roztokem (9).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10370.1 – Stanovení obsahu dekokochinátu metodou HPLC	Revize	1

Analýza standardů a sestavení kalibrační křivky

Linearita kalibrační křivky se testuje v rozmezí 0,015 µg/ml až 1,5 µg/ml. Na začátku a na konci sekvence vzorků se nastříkují kalibrační standardní roztoky dekokochinátu. Graf kalibrační závislosti se sestrojí jako závislost koncentrace dekokochinátu v µg/ml a odpovídající plochy píku. Jako matematický model závislosti se používá lineární regrese ($y = ax + b$).

Extrakt vzorku

Extrakt vzorku získaný dle 5.1, 5.2, 5.3 nebo 5.4 se nastříkuje několikrát (pokud je to nutné) tak, aby velikost nástřiku byla stejná jako u sestavení kalibrační křivky. Změří se plocha píků dekokochinátu ve vzorku.

Postup potvrzení (potvrzení)

V případě pochybností o identifikaci píku dekokochinátu v roztoku vzorku musí být použita potvrzující excitační vlnová délka 260 nm, emisní vlnová délka je 390 nm. Kalibrační standardní roztoky dekokochinátu a roztok vzorku musejí být nastříknuty do systému při těchto ($E_x = 260$ nm, $E_m = 390$ nm) potvrzujících podmínkách.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Určí se plocha píku u neznámého vzorku a porovnáním s kalibrační rovnicí se určí koncentrace dekokochinátu v analyzovaném roztoku vzorku. Koncentrace dekokochinátu A ve vzorku v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$A = \frac{c \times DF \times V}{m}$$

kde

c je koncentrace dekokochinátu ve vzorku (µg/ml),

V celková koncentrace extrakčního činidla přidaná k navážce zkušební vzorku (ml),

m navážka zkušební vzorku (g),

DF ředící faktor.