	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10390.1 – Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU ROBENIDINU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení robenidinu v krmivech a premixech.

2 Princip

Obsah robenidinu se stanoví po extrakci vzorku okyseleným roztokem methanolu, přečištění na pevné fázi, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC na reverzní fázi s použitím UV detekce.

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

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Acetonitril, HPLC grade.
- 2 Methanol, HPLC grade.
- 3 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$.
- 4 Extrakční roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 800 ml methanolu (2), přidá se 8 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3), doplní methanolem po značku a promíchá. Tento roztok se připravuje čerstvý před použitím.

- 5 Reagent iontových párů (1-HSA Na) - sodná sůl kyseliny hexansulfonové.
- 6 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , koncentrovaná 85%, $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71 \text{ g/ml}$.
- 7 Triethylamin, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$.

- 8 Mobilní fáze.


Příprava: V 1000ml odměrné baňce se ve 300 ml methanolu (2) a 300 ml acetonitrilu (1) rozpustí 0,9411 g sodné soli kyseliny hexansulfonové (5), přidá se 5 ml kyseliny fosforečné (6) a 5 ml triethylaminu (7), doplní vodou po značku a promíchá.

- 9 Robenidin, základní látka 96% min.

Robenidin, základní standardní roztok.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží takové množství robenidinu (9), aby výsledná koncentrace byla $200 \mu\text{g}$ v 1 ml. Navážka se rozpustí v methanolu (2) a po rozpuštění (ultrazvuk) se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (2) po značku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje $200 \mu\text{g}$ robenidinu.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10390.1 – Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

10 Kolona SPE, Alumina A Cartridges, např. Sep-Pak fa. Waters, Cat. No. WAT020500.

11 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

Poznámky

1 *Robenidin je citlivý na denní světlo, proto je třeba chránit jeho roztoky před přímým denním zářením.*

2 *Místo SepPak kolonek je možno použít i sypanou kolonu s oxidem hlinitým kyselým, stupeň aktivity I.*

Příprava: Chromatografická předčišťovací kolona (skleněná chromatografická kolona, opatřená ve spodu uzavíracím kohoutem, průměru 10 mm až 15 mm, délka 250 mm) se připraví tak, že na dno této chromatografické trubice umístěné vertikálně, se vloží smotek skelné vaty, upěchuje se a na ni se nasype 11 g oxidu hlinitého (oxid hlinitý alkalický, stupeň aktivity I) pokud možno tak, aby náplň kolony nebyla příliš vystavena volné atmosféře. Na připravenou kolonu se odpipetuje 5 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku, nechá se úplně vsáknout do náplně kolony a eluuje se z kolony 100 ml methanolu (2) do 250ml odpařovací baňky s kulatým dnem při průtoku 2 až 3 ml/min. Baňka se pak vloží do vakuové rotační odparky a obsah se nechá při teplotě 40 °C odpařit do sucha. Odparek se rozpustí v přesně odměřených 5 ml mobilní fáze. Před nástřikem do kolony přístroje se doporučuje roztok odstědit, aby nedošlo k možné kontaminaci částicemi oxidu hlinitého v sedimentu.

4 Přístroje a pomůcky

1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím.

2 Odparka vakuová, rotační.

3 Třepačka laboratorní.


4 Membránový filtr 0,45 µm.

5 Pracovní postup

Při zpracování vzorku je nutno zabránit přehřátí vzorku během homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Vzorek se homogenizuje a upravuje těsně před extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám robenidinu. Roztoky robenidinu se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Chrání se proto hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření. Extrakt vzorku se musí zpracovat nejpozději do 24 h po jeho přípravě.

Poznámky

3 *Z důvodu reprezentativnosti vzorku se nedoporučuje navažovat méně než 1 g. Extrakt je nutno vhodně naředit methanolem tak, aby 1 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku obsahoval teoreticky 5 µg robenidinu.*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10390.1 – Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

5.1 Extrakce

Do kónické 250ml baňky se naváží takové množství vzorku, aby koncentrace robenidinu v extraktu byla asi 5 µg robenidinu v 1 ml, tj. obvykle 25 g zkušebního vzorku krmné směsi, nebo 6 g zkušebního vzorku premixu doplňkových látek. Ke vzorku krmné směsi se přidá přesně 100,0 ml extrakčního roztoku (4), ke vzorku premixu doplňkové látky 150,0 ml extrakčního roztoku (4). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 30 min na laboratorní třepačce (3). Poté se rozpouští 5 min na ultrazvukové lázni. Pak se obsah v baňce nechá usadit a filtruje se přes suchý hustý skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Premixy doplňkových látek

Premixy doplňkových látek se naředí na požadovanou koncentraci kalibrační přímky (10 mg/l) mobilní fází (8). Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí 3 min při 10 000 ot/min nebo se filtruje přes membránový filtr (4).

Krmné směsi

Pro krmné směsi je nutno extrakt před nástřikem na chromatografickou kolonu přečistit extrakcí na tuhé fázi. Kolonka Sep-Pak Alumina A (10) se připojí k extrakční jednotce, na kolonku se nasadí injekční stříkačka o objemu 5 ml a patrona se kondicionuje 5 ml methanolu (2). Poté se na kolonku nanese 2,0 ml extraktu získaného podle 5.1 a extrakt se jímá do odpařovací baňky nebo vialky na 10 ml. Kolonka se propláchne 3 × 3 ml methanolu (2) a obsah baňky se odpaří pod proudem dusíku při teplotě 50 °C nebo na rotační vakuové odparce k suchu a odparek se rozpouští 30 s ve 2,0 ml mobilní fáze (8) na ultrazvukové lázni. Extrakt se odstředí 3 min při 10 000 ot/min nebo se filtruje přes membránový filtr (4). Takto připravený extrakt se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu. Koncentrace robenidinu v roztoku zkoušeného vzorku se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Chromatografické stanovení

Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje postupně (0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního standardního roztoku robenidinu (9), doplní se mobilní fází (8) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá obsahu robenidinu (4,0; 8,0; 16,0; 40,0) µg/ml. Takto připravené roztoky se nanášejí na kolonu HPLC. Průměrné hodnoty jim odpovídajících ploch píků slouží k sestrojení kalibrační křivky.


Separální podmínky HPLC

Kalibračních roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému.

Uvedené podmínky jsou doporučené. Mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně

Kapacitní faktor $k \geq 2,5$; Tailing faktor $\alpha \leq 1,3$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10390.1 – Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

Tabulka 1. Separační podmínky stanovení.

Kolona	Symmetry C ₁₈ , 5μm, 150 mm × 3,9 mm nebo podobná
Mobilní fáze	(8)
Průtok	1,0 ml/min
UV-detektor	314 nm
Objem nástřiku	10 μl
Teplota	Laboratorní nebo 38 °C
Retenční čas	5,0 min
Doba analýzy	8,0 min

6 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah robenidinu (*X*) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

kde

c je koncentrace robenidinu ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

V objem extraktu v ml,

m hmotnost zkušebního vzorku v g,

Rředění.