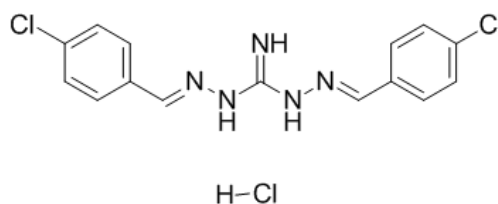
 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10394.1– Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU ROBENIDINU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu robenidinu v krmivech a premixech.



Obrázek 1. Robenidin hydrochlorid.

2 Princip

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

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Acetonitril, CH₃CN, pro HPLC.
- 2 Methanol, CH₃OH, pro HPLC.
- 3 Voda, H₂O, pro HPLC.
- 4 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, ρ = 1,18 g/ml.
- 5 Extrakční roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 800 ml methanolu (2), přidá se 8,0 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (4), doplní methanolem (2) po značku a promíchá. Roztok se připravuje čerstvý před použitím.

- 6 Oxid hlinitý, Al₂O₃, kyselý, stupeň aktivity I.

Příprava: 100 g oxidu hlinitého se naváží do vhodné nádoby a přidají se 2,0 ml vody (3). Zazátkuje se a protřepává ručně přibližně 20 min. Skladuje se v dobře uzavřené nádobě.

- 7 Molekulární síto. Typ 3A, 8 – 12 mesh; (1,6 – 2,5) mm perličky krystalického hlinitokřemičitanu, průměr pórů 0,3 mm.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10394.1– Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Revize	0


- 8 Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , roztok, $c = 0,025 \text{ mol/l}$.
Příprava: 0,85 g dihydrogenfosforečnanu draselného se rozpustí ve vodě (3) v 250ml odměrné baňce, doplní se vodou (3) po značku a promíchá.
- 9 Hydrogenfosforečnan sodný, Na_2HPO_4 , roztok $c = 0,025 \text{ mol/l}$.
Příprava: 0,89 g bezvodého (nebo 1,11 g dihydrátu, nebo 2,24 g dodekahydrátu) hydrogenfosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (3) v 250ml odměrné baňce, doplní se vodou (3) po značku a promíchá.
- 10 Mobilní fáze HPLC.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se smíchá 650 ml acetonitrilu (1), 250 ml vody (3), 50 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného (8) a 50 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (9) a promíchá se.
Přefiltruje se přes membránový filtr o velikosti pórů $0,22 \mu\text{m}$ a odplyní v ultrazvukové lázni nejméně 15 min.
- 11 Robenidin, 1,3-bis[(4-chlorobenzyliden)amino]guanidin hydrochlorid, (CAS: 25875-50-7).
- 12 Základní standardní roztok robenidinu, $c = 300 \text{ mg/l}$.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 30 mg robenidinu (11), poté se rozpustí pomocí ultrazvuku v extrakčním roztoku (5) a vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní extrakčním roztokem (5) po značku a promíchá.
- 13 Pracovní standardní roztok robenidinu, $c = 30 \text{ mg/l}$.
Příprava: Do 25ml odměrné baňky se převede 2,5 ml základního standardního roztoku (12), doplní se extrakčním roztokem (5) po značku a promíchá. Roztok se připravuje čerstvý před použitím.
- 14 Kalibrační roztoky.
Příprava: Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje postupně (1,0; 2,5; 5,0; 10,0) ml pracovního standardního roztoku robenidinu (13), doplní se mobilní fází (10) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá obsahu robenidinu (1,2; 3,0; 6,0; 12,0) mg/l. Takto připravené roztoky se použijí k nástřiku do HPLC a připravují se vždy čerstvé.

Poznámky

- 1 *Robenidin je citlivý na denní světlo, proto je třeba chránit jeho roztoky před přímým denním zářením.*
- 2 *Místo sypané kolony s oxidem hlinitým kyselým (stupeň aktivity I) je možné použít i SepPak kolonky.*

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s příslušenstvím.
- 2 Rotační vakuová odparka.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10394.1– Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Revize	0

- 3 Laboratorní třepačka s rozsahem např. 10 až 300 kmitů/min.
- 4 Membránový filtr, velikost pórů 0,45 µm.
- 5 Membránový filtr, velikost pórů 0,22 µm.
- 6 Ultrazvuková lázeň.
- 7 Skládaný filtr střední hustoty.

5 Pracovní postup

Při zpracování vzorku je nutno zabránit přehřátí vzorku během homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 1,0 mm a menší. Vzorek se homogenizuje a upravuje bezprostředně před extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám robenidinu. Extrakt vzorku se musí analyzovat nejpozději do 24 h po jeho přípravě.

Extrakce

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží asi 15 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností 0,01 nebo asi 1 g vzorku premixu s přesností 0,001 g. K navážce se přidá přesně 100,0 ml extrakčního roztoku (5). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 1 h na třepačce při asi 130 kmitech/min. Poté se přidá 7,5 g molekulárního síta (7), baňka se zazátkuje a nechá 5 min třepat. Potom se ihned přefiltruje přes suchý skládaný filtr střední hustoty do podložené nádoby a tento roztok se použije k přečištění.

Premixy doplňkových látek


Premixy se naředí na požadovanou koncentraci mobilní fáze (10). Před nástřikem do přístroje se extrakt vzorku přefiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Krmné směsi

Pro krmiva je nutné extrakt před nástřikem na chromatografickou kolonu přečistit extrakcí na tuhé fázi.

Příprava kolony: Chromatografická předčišťovací kolona (skleněná chromatografická kolona, opatřená ve spodu uzavíracím kohoutem, průměru 10 mm až 15 mm, délka 250 mm) se připraví bezprostředně před použitím tak, že na dno této chromatografické trubice umístěné vertikálně, se vloží smotek vaty, upěchuje se a na ni se nasype 11 g oxidu hlinitého (6) pokud možno s minimální časovou prodlevou. Oxid hlinitý se v naplněné koloně setřese lehkým poklepem na dolní konec kolony.

Na připravenou předčišťovací kolonu se odpipetuje 5 ml připraveného roztoku vzorku, špička pipety se při tom opře o stěnu kolony. Roztok se nechá 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 odpařky a obsah se nechá při teplotě asi 40 °C odpařit do sucha. Odparek se rozpustí přesně v 5,0 ml mobilní fáze (10), nechá se chvíli rozpustit v ultrazvukové lázni a před nástřikem do přístroje se přefiltruje

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10394.1– Stanovení obsahu robenidinu metodou HPLC	Revize	0

přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm, aby nedošlo k možné kontaminaci částicemi oxidu hlinitého v sedimentu.

Stanovení HPLC

Podmínky chromatografického stanovení uvedené v tabulce 1 jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Podmínky chromatografického stanovení – příklad nastavení.

Kolona pro kapalinovou chromatografii	Symmetry C18, 5µm, 150 mm × 3,9 mm nebo podobná
Mobilní fáze	viz (10)
Druh eluce	isokratická
Průtok	(0,8 – 2,0) ml/min
Objem nástřiku	20 µl
Vlnová délka detektoru	317 nm

6 Výpočet a vyjádření výsledku

Kalibrační křivka se sestojí vynesemím průměrných hodnot ploch píků kalibračních roztoků proti jejich koncentracím v mg/l.

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 vzorku v mg/l,
- V objem extraktu po rozpuštění odparku v ml (tj. 5 ml),
- R faktor ředění,
- m hmotnost vzorku v g.

7 Literatura

- 1 Nařízení komise (ES) č.152/2009 s uplatněním přílohy II, C tohoto Nařízení.