	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10400.1 – Stanovení obsahu lasalocidu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU LASALOCIDU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

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

2 Princip

Obsah lasalocidu se stanoví po extrakci vzorku mobilní fází a naředění metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s fluorescenční detekcí při excitační vlnové délce 310 nm a emisní vlnové délce 430 nm.

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

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Octan sodný trihydrát, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
- 2 Kyselina octová, CH_3COOH , $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g/ml}$, čistota pro HPLC.
- 3 Methanol, čistota pro HPLC.
- 4 Kyselina fosforečná, H_3PO_4 , 85%, $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71 \text{ g/ml}$.
- 5 Tlumivý octanový roztok.

Příprava: Do kádinky o objemu 1000 ml se naváží 3,402 g octanu sodného (1), přidá se 900 ml vody (8) a 5,0 ml kyseliny octové (2). Kyselinou fosforečnou (4) se upraví pH pomocí pH-metru (7) na hodnotu pH 4,0. Převeďte se do 1000ml odměrné baňky, doplní vodou (8) po značku a promíchá.

- 6 Mobilní fáze.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce se smíchá 200,0 ml tlumivého roztoku (5), přidá se methanol (3), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.


- 7 Lasalocid A, sodná sůl, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$, min. 98%.

Základní standardní roztok lasalocidu.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží takové množství standardní substance lasalocidu (7) s přesností 0,1 mg, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mg lasalocidu v 1 ml, doplní se methanolem (3) po značku a promíchá.

1 ml standardního roztoku obsahuje 0,1 mg lasalocidu.

- 8 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10400.1 – Stanovení obsahu lasalocidu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

4 Přístroje

- 1 Zařízení pro HPLC s FF detekcí.
- 2 Membránový filtr, materiál PTFE, velikost pórů 0,45 μm .
- 3 Membránový filtr, velikost pórů 0,22 μm .
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka.
- 6 Odstředivka.
- 7 pH-metr.

5 Pracovní postup

Vzorek se homogenizuje a mele na částice o velikosti 0,5 mm až 1,0 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a šrotování. Vzorek se upravuje těsně před extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám lasalocidu. Roztoky a extrakty lasalocidu se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.

5.1 Extrakce lasalocidu (krmné směsi a premixy)

Do kónické baňky na 250 ml až 500 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 1 mg až 20 mg lasalocidu s přesností na 0,001 g (obvykle 5 g pro premixy doplňkových látek a 25 g pro krmné směsi). Zkušební vzorek se přelije podle obsahu lasalocidu 100,0 ml až 200,0 ml mobilní fáze (6), baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce (5) 30 min. Poté se filtruje přes suchý skládaný filtr do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml filtrátu se nepoužije.

5.2 Ředění

Extrakt zkušební vzorku získaný podle 5.1 se naředí mobilní fází (6) na koncentraci asi 10 mg/l. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok odstředí na laboratorní odstředivce (6) po dobu 3 min. při 10 000 ot/min nebo se roztok přefiltruje přes nástřikový filtr (2, 3).


5.3 Chromatografické stanovení

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

Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně

Kapacitní faktor $k \geq 2,5$,

Tailing faktor $t_{\alpha} \leq 1,35$.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10400.1 – Stanovení obsahu lasalocidu metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

Tabulka 1. Separační podmínky chromatografického systému.

Kolona	Nova-Pak C ₁₈ , 4 μm, (150 × 3,9) mm nebo podobná
Průtok	1 ml/min
Teplota	Laboratorní nebo 38 °C
FL-detektor	Extinkce 310 nm, emise 430 nm
Objem nástřiku	5 μl
Retenční čas	4,2 min (pro uvedenou kolonu a teplotu okolí)

Podmínky jsou doporučené, mohou být použity i jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

5.4 Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,5; 1,0; 2,0; 4,0) ml základního roztoku lasalocidu. Doplní se mobilní fází (6) po značku a promíchá. Takto nařaděné pracovní roztoky odpovídají koncentraci (2,0; 4,0; 8,0; 16,0) mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 5 μl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

Poznámky

- 1 *K extrakci lze místo mobilní fáze použít i jiné extrakční činidlo.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 10 ml kyseliny fosforečné (4), přidá se 150 ml vody (8), doplní methanolem (3) po značku a promíchá.*

6 Výpočet

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

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

kde

- c je koncentrace lasalocidu odečtená z kalibrační křivky v mg/l,
- m hmotnost zkušební vzorku v g,
- V objem extraktu v ml,
- R ředění, resp. zkoncentrování.