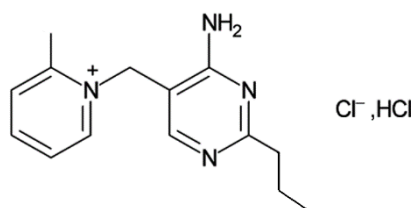
	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10636.1– Stanovení obsahu amprolia metodou HPLC	Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU AMPROLIA METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

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



Obrázek 1. Amprolium hydrochlorid.


2 Princip

Obsah amprolia se stanoví po extrakci ze vzorku extrakčním roztokem a naředěním mobilní fází metodou HPLC na koloně s katexem a s použitím UV detekce.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, CH₃OH, pro HPLC.
- 2 Acetonitril, CH₃CN, pro HPLC.
- 3 Voda, H₂O, pro HPLC.
- 4 Dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát, NaH₂PO₄·H₂O, roztok, c = 0,1 mol/l.
Příprava: 6,90 g dihydrogenfosforečnanu sodného se rozpustí ve vodě (3) v 500ml odměrné baňce, doplní se vodou (3) po značku a promíchá.
- 5 Chloristan sodný, monohydrát, NaClO₄·H₂O, roztok, c = 1,6 mol/l.
Příprava: 22,47 g chloristanu sodného se rozpustí ve vodě (3) ve 100ml odměrné baňce, doplní se vodou (3) po značku a promíchá.
- 6 Mobilní fáze pro HPLC.
Příprava: Připraví se potřebný objem směsi acetonitrilu (2), methanolu (1), roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného (4) a roztoku chloristanu sodného (5) tak, aby poměr jednotlivých komponent ve směsi byl (250 + 200 + 450 + 100), (V + V + V + V). Směs se před použitím přefiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,22 μm a odplyne v ultrazvukové lázni nejméně 15 min.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10636.1– Stanovení obsahu amprolia metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

7 Extrakční roztok.

Příprava: Připraví se 900 ml směsi methanolu (1) a vody (3), 600 + 300 (V + V).

8 Amprolium hydrochlorid, standardní látka, (C₁₄H₁₉N₄Cl·HCl), 1-[(4-amino-2-propyl-pirimidinyl)methyl]-2-picoliniumchlorid hydrochlorid, (CAS: 137-88-2), E750.

9 Základní standardní roztok amprolia, c = 500 mg/l.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg amprolia (8), rozpustí se v 80 ml methanolu (1) a vloží se na 10 min do ultrazvukové lázně. Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní se vodou (3) po značku a promíchá. Při uchování ve tmě a v chladu při teplotě (4 – 8) °C je stálý jeden měsíc.

10 Pracovní standardní roztok amprolia, c = 50 mg/l.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 5,0 ml základního standardního roztoku (9), doplní se po značku extrakčním roztokem (7) a promíchá. Při uchování ve tmě a v chladu při teplotě (4 – 8) °C je stálý jeden měsíc.

11 Kalibrační roztoky.


Příprava: Do sady 50ml odměrných baněk se napipetuje (0,5; 1,0; 2,0) ml pracovního standardního roztoku (10), doplní se po značku mobilní fází (6) a promíchá. Získá se sada kalibračních roztoků o koncentraci (0,5; 1,0; 2,0) mg/l amprolia. Takto připravené roztoky se použijí k nástřiku do HPLC a připravují se vždy čerstvé.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s příslušenstvím.
- 2 Membránový filtr, materiál PTFE, velikost pórů 0,45 µm.
- 3 Membránový filtr, velikost pórů 0,22 µm.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Laboratorní třepačka s rozsahem např. 10 až 300 kmitů/min.
- 6 Skládáný 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 a upravuje se těsně před extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám analytu.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10636.1– Stanovení obsahu amprolia metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

Krmiva a premixy (obsah amprolia < 1 %)

Podle obsahu amprolia se do 250ml Erlenmayerovy baňky naváží asi (1 – 25) g vzorku s přesností na 0,01 g a přidá se 100 ml extrakčního roztoku (7).

Premixy (obsah amprolia > 1 %)

Podle obsahu amprolia se do 500ml Erlenmayerovy baňky naváží asi (1 – 4) g premixu s přesností na 0,001 g a přidá se 200 ml extrakčního roztoku (7).

Extrakce

Baňka se vloží do ultrazvukové lázně na 15 min, poté se vyjme a 1 h se třepe na třepačce při asi 130 kmitech/min. Extrakt se zfiltruje přes suchý skládaný filtr střední hustoty do suché podložené nádoby, naředí se na požadovanou koncentraci kalibrační křivky mobilní fáze (6) a naředěný roztok se přefiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm do vialky a použije se k nástřiku do HPLC.

Poznámka


1 *Extrakt by se měl vždy ředit mobilní fází, jinak se retenční čas píku amprolia značně posouvá změnami iontové síly.*

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	125 mm × 4 mm, katex Nucleosil 10 SA, náplň 5 µm, nebo obdobná
Mobilní fáze	viz (6)
Druh eluce	isokratická
Průtok	(0,7 – 1,0) ml/min
Objem nástřiku	50 µl
Vlnová délka detektoru	264 nm

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10636.1– Stanovení obsahu amprolia metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	0

6 Výpočet a vyjádření výsledků

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

Obsah amprolia (X) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle vztahu

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

Kde

c je koncentrace amprolia v extraktu vzorku v mg/l,

V objem extrakčního roztoku v ml,

R faktor ředění,

m hmotnost vzorku v g.

Poznámky

- 2 Podle britského lékopisu vykazuje spektrum roztoku amprolia ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) v kyselině chlorovodíkové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) maxima při 246 nm a 262 nm. Absorbance by měla být 0,84 při 246 nm a 0,80 při 262 nm.

7 Literatura

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