	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10391.1 – Stanovení obsahu dimetridazolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU DIMETRIDAZOLU METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dimetridazolu v krmivech a premixech.

Poznámky

1 *Dimetridazol se používá jako chemoterapeutikum. Po chemické stránce se jedná o 1,2-dimethyl-5-nitro-imidazol (sumárního vzorce $C_5H_7N_3O_2$, $M_r = 141,1$ g/mol).*

2 Princip

Obsah dimetridazolu se stanoví po extrakci vzorku 90% methanolem. Následně se přečistí na pevné fázi a stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií HPLC na reverzní fázi s UV detekcí při 309 nm.

3 Chemikálie


Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Methanol, HPLC grade.
- 2 Acetonitril, HPLC grade.
- 3 Extrakční směs, methanol (1) + voda (8), (9 + 1).
- 4 Mobilní fáze, acetonitril (2) + voda (8), (7 + 3).
- 5 Dimetridazol, základní látka (dále jen DMT), CAS 551-92-8, $M_r = 141,1$, $C_5H_7N_3O_2$,
- 6 Dimetridazol, základní roztok.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky se naváží přesně asi 50 mg dimetridazolu (5), rozpustí v asi 180 ml methanolu (1) na ultrazvukové lázni a po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou (8) po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 mg DMT.

- 7 Kolona SPE, Alumina B Cartridges, např. Sep-Pak, Waters cat.n. WAT 020505.
- 8 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10391.1 – Stanovení obsahu dimetridazolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen HPLC) s příslušenstvím a UV detektorem.
- 2 Laboratorní třepačka.
- 3 Membránový filtr 0,45 µm.
- 4 Laboratorní odstředivka.

5 Pracovní postup

5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

5.2 Extrakce

Do 250ml kónické baňky se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku (nejméně 2 g zkušebního vzorku, nejvíce 20 g), aby po extrakci a následném ředění byla koncentrace dimetridazolu (4 – 40) µg/ml. Pak se přidá přesně 100,0 ml extrakční směsi (3) a kónická baňka se uzavře zátkou se zábrusem. Obsah se promíchá a extrahuje na laboratorní třepačce (2) po dobu 30 min. Poté se obsah baňky nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Je-li třeba, extrakt se naředí na požadovanou koncentraci extrakčním roztokem.

Krmné směsi

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na pevné fázi. Kolonka SPE (7) se připojí k polyetylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlijí asi 3 ml extraktu získaného podle prvního odstavce 5.2. Na kolonku se nanese asi 1 ml extraktu a nechá se 20 s kondicionovat. Potom se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonkou, přičemž první podíl extraktu (0,1 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu. Na chromatografickou kolonu se nastříkuje objem 10 µl extraktu.


Premixy

Extrakt získaný podle 5.2 se naředí extrakčním roztokem (3) na koncentraci asi 10 mg/kg. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se získaný extrakt filtruje přes membránový filtr (3) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4) při 10000 ot/min. Na chromatografickou kolonu se nastříkuje objem 10 µl extraktu.

5.3 Chromatografické stanovení

Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk se postupně pipetuje (0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního roztoku DMT (6), odměrné baňky se doplní extrakční směsí (3) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci (4; 8; 16; 40) µg/ml DMT.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10391.1 – Stanovení obsahu dimetridazolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

Kalibrační roztoky dimetridazolu (10 µl) se po ustavení rovnováhy na koloně nastříkují na chromatografickou kolonu a ze získaných průměrných ploch jim odpovídajícím píkům se sestrojí kalibrační graf.

Separční podmínky HPLC

Kalibrační 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 $t_{\alpha} \leq 1,3$.

Tabulka 1. Separční podmínky chromatografického systému.

Kolona	Reverzní fáze C ₁₈ , 4 µm, (150 × 3,9) mm NovaPak nebo podobná
Mobilní fáze	(4)
Průtok	0,75 ml/min
UV-detektor	309 nm
Objem nástřiku	10 µl
Teplota	Laboratorní
Retenční čas	Asi 2,4 min pro uvedenou kolonu

6 Výpočet a vyjádření výsledku

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

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

kde

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

V objem extraktu v ml,

m hmotnost zkušebního vzorku v g,

R ředění.

7 Literatura

1 Vyhláška 124/2001, příloha 10, postup 3.1

2 ČSN 46 7092-64 Metody zkoušení krmiv. Část 64: Stanovení obsahu dimetridazolu