	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU NIKARBAZINU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení nikarbazinu v krmivech a premixech. Současně umožňuje zjištění nevyhnutelné křížové kontaminace necílového krmiva nikarbazinem.

2 Princip

Obsah nikarbazinu se stanoví po extrakci ze vzorku extrakčním roztokem acetonitril – voda a naředění mobilní fází metodou HPLC na koloně C18 a UV detekcí při vlnové délce $\lambda = 351$ 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 Acetonitril, čistota pro HPLC.
- 2 Extrakční roztok acetonitrilu.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 800 ml acetonitrilu (1), doplní vodou (3) po značku a promíchá.
- 3 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 4 Mobilní fáze (acetonitril : voda), (570 : 430), (v/v).
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 570 ml acetonitrilu (1), doplní vodou (3) po značku a promíchá.
- 5 Kalibrační standard nikarbazin, základní látka, $C_{19}H_{18}N_6O_6$.
Příprava základního standardního roztoku nikarbazinu: Do 100ml odměrné baňky se naváží 10 mg nikarbazinu, rozpustí se asi v 50 ml extrakčního roztoku (2) v ultrazvukové lázni. Po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní extrakčním roztokem (2) po značku a promíchá. Výsledná koncentrace odpovídá 0,1 mg nikarbazinu v 1 ml.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf s fluorescenčním a UV detektorem.
- 2 Ultrazvuková lázeň.
- 3 Mikrostříkačka, 50 μ l, 100 μ l, 250 μ l, např. Hamilton.
- 4 Laboratorní třepačka, např. horizontální, 150 kyvů/min.
- 5 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 7 Automatická pipeta (0,1 – 5,0) ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Revize	2

5 Postup

5.1 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky pro premixy a krmné směsi

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního roztoku nikarbazinu (5) a doplní po značku mobilní fází (4). Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci (2,0; 4,0; 8,0; 20,0) mg/l nikarbazinu.

Kalibrační roztok pro kontaminace

Do 25ml odměrné baňky se mikrostříkačkou (3) odměří 50 μ l základního standardního roztoku nikarbazinu (5), doplní se mobilní fází (4) po značku a promíchá. Kalibračních úrovní se docílí nástřikem dávkovače přístroje. 1 ml výsledného kalibračního roztoku obsahuje 0,2 μ g nikarbazinu. Ostatní kalibrační roztoky se připraví nástřikem stroje podle tabulky 1.

Tabulka 1. Koncentrace kalibračních úrovní nástřikem stroje.

Kalibrační úroveň	Nástřik (μ l kalibračního roztoku pro kalibrace)	Koncentrace (μ g/ml)
1	100	2
2	50	1
3	10	0,2
4	5	0,1

Poznámky


- Je také připravit si jednotlivé kalibrační úrovně samostatně a použít stejný objem nástřiku strojem*
- Kalibrace se provádí před každým měřením.*
- Kalibrační roztoky se připravují vždy čerstvé a rozsah kalibrační křivky se použije podle deklarované hodnoty analytu.*

5.2 Vlastní stanovení nikarbazinu

Extrakce

Premixy doplňkových látek

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem se naváží 1 g zkušební vzorku, přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2), baňka se uzavře zátkou a třepe se 60 min na laboratorní třepačce. Poté se baňka vloží na 5 min do ultrazvukové lázně. Obsah baňky se nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Podle deklarovaného obsahu nikarbazinu se extrakt naředí mobilní fází (4) na koncentraci (2 – 20) mg/l.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Revize	2

Krmné směsi

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem se naváží 20 g zkušební vzorku, přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2), baňka se uzavře zátkou a třepa se 60 min na laboratorní třepače. Poté se baňka vloží na 5 min do ultrazvukové lázně. Obsah baňky se nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije.

Kontaminace

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem se naváží 25 g zkušební vzorku krmné směsi nebo premixu, přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2), baňka se uzavře zátkou a třepa se 60 min na laboratorní třepače. Poté se baňka vloží na 5 min do ultrazvukové lázně. Obsah baňky se nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije.

Poznámky


- 4 *Roztoky a extrakty nikarbazinu se musejí chránit před přímým slunečním světlem a UV zářením. Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.*

Stanovení nikarbazinu metodou HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému, které jsou doporučené. Mohou se použít jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Tabulka 2. Příklad separačních podmínek kapalinového chromatografu.

Kolona	Discovery HS C18 4,6 mm × 150 mm (SUPELCO) nebo ekvivalentní
Mobilní fáze	(4)
Průtok	0,8 ml/min
Teplota	40 °C
Objem nástřiku	10 µl
Retenční čas	3,8 až 3,9 min
Doba analýzy	20 min
UV detektor	UV $\lambda = 351$ nm

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv	Vydání	1
	10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Revize	2

Tabulka 3. Gradient pumpy.

Gradient pumpy			
Čas (min)	Průtok (ml/min)	Voda (%)	Acetonitril (%)
0	0,8	43	57
8	0,8	43	57
8,1	0,8	10	90
15	0,8	10	90
15,1	0,8	43	57
20	0,8	43	57

Poznámky

5 *Tento gradient je zvolen z důvodu promývání kolony.*

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah nikarbazinu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočte podle vztahu

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

kde

c je koncentrace odečtená z kalibrační křivky v mg/l,

V objem extraktu v ml,

R ředění resp zakoncentrování vzorku,

m_a hmotnost zkušební vzorku v g.

7 Literatura

1 ČSN EN 15782 Krmiva – Stanovení nikarbazinu – Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Rok vydání 2011.