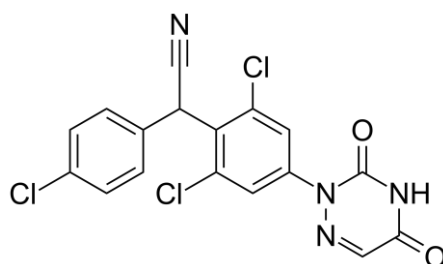
	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10393.1– Stanovení obsahu diclazurilu metodou HPLC	Revize	0

## STANOVENÍ OBSAHU DICLAZURILU METODOU HPLC

### 1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky stanovení obsahu diclazurilu v krmivech a premixech.



**Obrázek 1. Diclazuril.**

### 2 Princip


Obsah diclazurilu se stanoví po extrakci vzorku okyseleným methanolem, u krmiv po přečištění na pevné fázi, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda, H<sub>2</sub>O, pro HPLC.
- 2 Octan amonný, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>.
- 3 Tetrabutylamonium hydrogensíran (TBHS), [N(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>]HSO<sub>4</sub>.
- 4 Acetonitril, CH<sub>3</sub>CN, pro HPLC.
- 5 Methanol, CH<sub>3</sub>OH, pro HPLC.
- 6 N,N-dimethylformamid, (DMF), HCON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.
- 7 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, ρ = 1,18 g/ml.
- 8 Standardní látka: Diclazuril, C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>C<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 2,6-dichloro-alfa-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)-yl)benzenacetonitril, (CAS: 101 831-37-2).
- 9 Základní standardní roztok diclazurilu, c = 100 mg/l.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 5 mg diclazurilu (8), rozpustí se v DMF (6), jímž se poté doplní po značku a promíchá. Při uchování ve tmě a v chladu při teplotě (4 – 8) °C je stálý jeden měsíc.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10393.1– Stanovení obsahu diclazurilu metodou HPLC	Revize	0

10 Interní standard: Bis-Diclazuril,  $C_{18}H_{11}Cl_3N_4O_2$ , 2,6-dichloro-alfa-(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2-(3-H)-yl)-alfa-methylbenzen-acetonitril, (CAS: 103 337-71-9).

11 Interní základní standardní roztok,  $c = 200 \text{ mg/l}$ .

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží 10 mg interní standardní substance (10) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v DMF (6), poté se jím doplní po značku a promíchá. Při uchování ve tmě a v chladu při teplotě (4 – 8) °C je stálý jeden měsíc.

12 Interní standardní roztok,  $c = 50 \text{ mg/l}$ .

Příprava: Do 10ml odměrné baňky se převede 2,5 ml interního základního standardního roztoku (11), doplní se DMF (6) po značku a promíchá. Při uchování ve tmě a v chladu při teplotě (4 – 8) °C je stálý jeden měsíc.

13 Extrakční roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 800 ml methanolu (5), přidá se 5,0 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (7), doplní methanolem (5) po značku a promíchá.

14 Promývací roztok.

Příprava: Připraví se 100 ml směsi extrakčního roztoku (13) s vodou (1), 65 + 35 (V + V).

15 Eluční roztok.

Příprava: Připraví se 100 ml směsi extrakčního roztoku (13) s vodou (1), 80 + 20 (V + V).

16 Ředící roztok.

Příprava: Připraví se 150 ml směsi DMF (6) s vodou (1), 60 + 90 (V + V).

17 Mobilní fáze pro HPLC.

Složka (eluent) A: Roztok octanu amonného a tetrabutylamonium hydrogensíranu.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 5 g octanu amonného (2) a 3,4 g TBHS (3), rozpustí se ve vodě (1) a doplní po značku. Přefiltruje se přes membránový filtr o velikosti pórů 0,22  $\mu\text{m}$  a odplyní v ultrazvukové lázni nejméně 15 min.

Složka (eluent) B: acetonitril (4).

Složka (eluent) C: methanol (5).

#### 4 Přístroje a pomůcky


1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s příslušenstvím.

2 Laboratorní třepačka s rozsahem např. 10 až 300 kmitů/min.

3 Vakuová pumpa.

4 Rotační vakuová odparka.

5 Membránový filtr, velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ .

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10393.1– Stanovení obsahu diclazurilu metodou HPLC	Revize	0

- 6 Membránový filtr, velikost pórů 0,22 µm.
- 7 Ultrazvuková lázeň.
- 8 SPE patrona C<sub>18</sub>, např. Sep-Pak Vac 20cc (5 g), C18 Cartridges, Waters (WAT036925).

## 5 Postup

Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 1,0 mm a menší.

### Extrakce krmiv

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se zábrusem se naváží asi 25 g vzorku s přesností na 0,01 g. Přidá se 1,0 ml interního standardního roztoku (12) a 100 ml extrakčního roztoku (13) a baňka se uzavře. Směs se přes noc třepe na třepačce při asi 130 kmitech/min. Poté se nechá 10 min usadit, zfiltruje se přes suchý skládaný filtr a z filtrátu se 20 ml supernatantu odpipetuje do vhodné skleněné nádoby a zředí 20 ml vody. Tento roztok se nanese na extrakční SPE kolonku a prosaje se pomocí vakua. Kolonka se promyje 25 ml promývacího roztoku (14). Tento eluát se odstraní do odpadu. Účinná látka a interní standard se eluují 25 ml elučního roztoku (15). Tato frakce se odpaří v rotační odparce asi při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí přesně v 5,0 ml ředícího roztoku (16) a promíchá. Před nástřikem do přístroje se přefiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

### Extrakce premixů

Do 250ml Erlenmayerovy baňky se naváží asi 0,5 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidají se 2,0 ml interního standardního roztoku (12), 100 ml extrakčního roztoku (13) a baňka se uzavře. Směs se přes noc třepe na třepačce při asi 130 kmitech/min. Poté se nechá 10 min usadit, odpipetuje se vypočítaný objem 10 000/p ml ( $p$  = deklarovaný obsah diclazurilu v premixu v mg/kg) do baňky s kulatým dnem vhodné velikosti. V rotační odparce se odpaří za sníženého tlaku asi při 60 °C do sucha. Odparek se rozpustí v 5,0 ml ředícího roztoku (16) a promíchá. Před nástřikem do přístroje se přefiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm.


### Kalibrace

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5) ml základního standardního roztoku diclazurilu (9) a doplní se ředícím roztokem (16) po značku. Při výpočtu obsahu diclazurilu za pomoci vnitřního standardu, se přidá do jednotlivých odměrných baněk ještě před doplněním ředícím roztokem přesně 1 ml interního standardního roztoku (12).

Kalibrační křivka se sestojí vynesemím poměru ploch píků (standardu ku vnitřnímu standardu) kalibračních roztoků proti jejich koncentracím v mg/l.

### Poznámky

- 1 *Lze použít i jednobodovou kalibraci, kalibrační roztok diclazurilu:  $c = 2$  mg/l.  
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se odpipetuje 1,0 ml základního standardního roztoku diclazurilu (9) a 2,0 ml interního standardního roztoku (12), doplní se po značku ředícím roztokem (16) a promíchá se. Tento roztok se musí připravovat před použitím vždy čerstvý.  
Provede se několikrát nástřik kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota ploch píků diclazurilu a interního standardu.*

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10393.1– Stanovení obsahu diclazurilu metodou HPLC	Revize	0

## 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	C18, 150 mm × 4,6 mm, náplň 5 μm, nebo obdobná
Mobilní fáze	viz (17), 40 % A + 30 % B + 30 % C
Druh eluce	isokratická
Průtok	(1,4 – 2,0) ml/min
Objem nástřiku	(20 – 50) μl
Vlnová délka detektoru	280 nm

### Poznámky

2 Pro stanovení diclazurilu lze použít i gradientovou eluci, viz tabulka 2.

**Tabulka 2. Průběh gradientové eluce.**

Čas min	Složka A (%)	Složka B (%)	Složka C (%)
0	60	20	20
10	60	20	20
40	45	20	35
40,1		100	
50		100	
50,1	60	20	20
55	60	20	20

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b>	Vydání	1
	10393.1– Stanovení obsahu diclazurilu metodou HPLC	Revize	0

## 6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah diclazurilu ( $X$ ) v mg/kg ve vzorku se vypočte podle výpočetního vztahu

$$X = \frac{\frac{Area_{d,s}}{Area_{i,s}} - b}{a} \times \frac{R \times V}{m}$$

Kde

- $X$  je obsah diclazurilu ve vzorku v mg/kg,  
 $Area_{(d,s)}$  plocha píku diclazurilu v roztoku vzorku,  
 $Area_{(i,s)}$  plocha píku interního standardu v roztoku vzorku,  
 $b$  průsečík (intersept) kalibrační křivky, sestavené z kalibračních roztoků,  
 $a$  směrnice (slope) kalibrační křivky, sestavené z kalibračních roztoků,  
 $R$  faktor ředění,  
 $V$  konečný objem extraktu po rozpuštění odparku v ml (tj. 5 ml),  
 $m$  hmotnost vzorku v g.

### **Poznámka**

- 3 *Lze využít zkoušku na výtěžnost metodou standardního přídatku.*

## 7 Literatura

- 1 Nařízení komise (ES) č.152/2009 s uplatněním přílohy II, C, tohoto Nařízení.
- 2 Technická zpráva JRC: Revalidace metody stanovení diclazurilu z r. 2016.