	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

## 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.

Nikarbazin je ekvimolární směs 4,4'-dinitrokarbanilidu (DNC) a 4,6-dimethyl-2- pyriminolu (HDP). Podle této metody se stanovuje obsah DNC.

### 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  $\lambda = 351 \text{ nm}$ .

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


### 3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- Acetonitril, čistota pro HPLC.
- Extrakční roztok acetonitrilu.  
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 800 ml acetonitrilu (1), doplní vodou (3) po značku a promíchá.
- Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 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.
- Kalibrační standard nikarbazin, základní látka,  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_6$ , CAS 330-95-0  
Mr = 426,38,  
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 je asi 100 mg/l.

### 4 Přístroje a pomůcky

- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s fluorescenčním a UV detektorem.
- Ultrazvuková lázeň.
- Laboratorní třepačka, např. horizontální, 150 kyvů/min.
- Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

- 5 Automatické pipety v rozsahu (0,01 – 5,0) ml; (0,1 – 5,0) ml; (0,05 – 1,0) ml; (0,015 – 0,3) ml.

## 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 fázi (4). Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci (2,0; 4,0; 8,0; 20,0) mg/l nikarbazinu.

#### Kalibrační roztok pro kontaminace

Do sady 25ml odměrných baněk se pipetuje (0,025; 0,05; 0,25; 0,5) ml základního roztoku nikarbazinu (5) a doplní po značku mobilní fázi (4). Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci (0,1; 0,2; 1,0; 2,0) mg/l nikarbazinu.

#### **Poznámky**

- 1 *Kalibrace se provádí před každým měřením.*
- 2 *Kalibrační roztoky se připravují vždy čerstvé a rozsah kalibrační křivky se použije podle deklarované hodnoty analytu.*

### 5.2 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.

### 5.3 Vlastní stanovení nikarbazinu


#### **Extrakce**

##### Premixy doplňkových látek

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem se naváží 1 g zkušebního vzorku, přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2), baňka se uzavře zátkou a třepe 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. Podle deklarovaného obsahu nikarbazinu se extrakt naředí mobilní fází (4) na koncentraci (2 – 20) mg/l.

##### Krmné směsi

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem se naváží 20 g zkušebního vzorku, přidá se 100 ml extrakčního roztoku (2), baňka se uzavře zátkou a třepe 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.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

### Kontaminace

Do 250ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem se naváží 25 g zkušebního vzorku krmné směsi nebo premixu, 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.

### **Poznámky**

3 *Roztoky a extrakty nikarbazinu se musí 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 doporučeny. Mohou se použít jiné podmínky za předpokladu, že poskytnou rovnocenné výsledky.

**Tabulka 1. 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

**Tabulka 2. 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

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	<b>Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv</b> 10360.1 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

## Poznámky

4 *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.