	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10635.1 – Stanovení obsahu nifursolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU NIFURSOLU METODOU HPLC

1 Rozsah a účel

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu nifursolu v krmivech metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.


2 Princip

Nifursol se stanoví po extrakci ze vzorku směsným rozpouštědlem tetrahydrofuran – acetonitril – voda metodou HPLC na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná) odpovídající stupni 1 podle EN ISO 3696.
- 2 Acetonitril, čistota pro HPLC.
- 3 Kyselina trifluoroctová, CF_3COOH , HPLC grade.
- 4 Kyselina octová, CH_3COOH .
- 5 Hydroxid sodný, pevný, NaOH.
- 6 Tetrahydrofuran, $(\text{CH}_2)_4\text{O}$.
- 7 Hydroxid sodný, NaOH, roztok, $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol/l}$.
Příprava: 40 g hydroxidu sodného (5) se rozpustí ve vodě (1), převede do 100ml odměrné baňky a doplní po značku.
- 8 Mobilní fáze.
Příprava: Do 1000ml kádinky se odměří 380 ml acetonitrilu (2), přidá se 1 ml kyseliny trifluoroctové (3), 9 ml kyseliny octové (4) a 450 ml vody (1). pH tohoto roztoku se upraví vodným roztokem hydroxidu sodného (7) na hodnotu 5,0 a roztok se převede do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.
- 9 Extrakční roztok.
Příprava: V 1000ml kádince se smíchá se 400 ml tetrahydrofuranu (6), 200 ml acetonitrilu (2) a 400 ml vody (1). Roztok se převede do uzavíratelné lahve.
- 10 Butylhydroxytoluen (BHT), $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, $M_r = 220,4 \text{ g/mol}$.
- 11 Nifursol, standardní látka, $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}$, $M_r = 365,21 \text{ g/mol}$.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10635.1 – Stanovení obsahu nifursolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

12 Základní standardní roztok nifursolu, $c = 200 \text{ mg/l}$.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 0,02 g nifursolu (11) s přesností na 0,0001 g, přidá se 50 mg BHT (10) a rozpustí se v asi 80 ml tetrahydrofuranu (6) na ultrazvukové lázni. Po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní tetrahydrofuranem (6) po značku a promíchá se.

Poznámky

1 *Se všemi rozpouštědly a roztoky se pracuje výhradně v digestoři. Používají se bezpečnostní brýle, ochranný oděv a je nutné vyhnout se kontaktu s pokožkou.*

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s UV detekcí.
- 2 pH-metr.
- 3 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Laboratorní třepačka horizontální.
- 6 Laboratorní odstředivka.
- 7 Membránové filtry 0,45 μm , PTFE 25 mm.
- 8 Husté skládané papírové filtry.

5 Postup

5.1 Úprava zkušební vzorku


Zkušební vzorek se upraví podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP ÚKZÚZ 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých krmiv.

Vzorek se homogenizuje a upravuje na částice o velikosti (0,5 – 1,0) mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku a působení přímého slunečního světla během přípravy. Upravuje se těsně před jeho zpracováním, aby se zabránilo ztrátám analytu.

5.2 Extrakce

5.2.1 Premixy doplňkových látek

Do 250ml zábrusové kónické baňky se naváží 2 g vzorku s přesností 0,1 mg, přidá se 150 ml tetrahydrofuranu (6) a asi 100 mg BHT (10). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 30 min na laboratorní třepačce (130 – 140) kmitů/min. Poté se baňka vloží na 10 min do ultrazvukové lázně. Obsah baňky se převede pomocí asi 90 ml vody (1) do 250ml odměrné baňky, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá. Obsah baňky se nechá ustát a extrakt se přefiltruje přes hustý skládaný papírový filtr do suché nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Podle předpokládaného

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10635.1 – Stanovení obsahu nifursolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

obsahu nifursolu se extrakt naředí extrakčním roztokem (9) na koncentraci asi (4 – 40) mg/l, přes membránový filtr 0,45 µm se přefiltruje asi 1 ml a filtrát se použije k nástřiku do HPLC systému.

Poznámky

2 *Místo membránové filtrace lze extrakt odstředit 3 min při 5000 ot/min.*

5.2.2 Krmné směsi

Do kónické 250ml baňky se naváží 20 g zkušební vzorku, přidá se asi 100 mg BHT (10) a 100 ml extrakčního roztoku (9). Baňka se třepe 30 min na laboratorní třepačce (130 – 140) kmitů/min a pak se vloží na 10 min do ultrazvukové lázně. Obsah baňky se nechá ustát a extrakt se přefiltruje přes hustý skládaný papírový filtr do suché nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Asi 1 ml získaného extraktu se filtruje přes membránový filtr 0,45 µm a použije k nástřiku do HPLC systému.

5.3 Příprava kalibračních roztoků

Externí kalibrační křivka

Kalibrační roztoky se připravují vždy čerstvé.

Do série pěti 25ml odměrných baněk se odpipetuje (0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0) ml základního standardního roztoku nifursolu (12), doplní po značku extrakčním roztokem (9) a promíchá se. Tyto roztoky odpovídají koncentracím (0; 4; 8; 16; 40) mg/l nifursolu.

Kalibrační křivka se sestojí z hodnot ploch píků odpovídajících jednotlivým kalibračním bodům.


5.4 Stanovení HPLC

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému.

Následující podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Kolona	Symmetry Shield C18, 5 µm, (4,6 × 250) mm nebo obdobná
Mobilní fáze	Mobilní fáze (8)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Detektor UV	383 nm
Objem nástřiku	10 µl
RT nifursolu	8,0 min (pro uvedenou kolonu)
Doba analýzy	12 min

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10635.1 – Stanovení obsahu nifursolu metodou HPLC	Vydání	2
		Revize	0

Stabilita chromatografického systému se kontroluje nástřikem kalibračního roztoku, dokud není dosaženo konstantních ploch píků a retenčních časů.

V každé sérii vzorků se provede i stanovení slepého pokusu a vhodného IRM.

6 Výpočet výsledků

Obsah nifursolu (X) ve vzorku (mg/kg) se vypočítá podle vztahu

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

c koncentrace nifursolu ve zkoušeném vzorku (mg/l) odečtená z kalibrační křivky,

V objem extraktu vzorku (ml),

m hmotnost zkušební vzorku (g),

R faktor ředění.

7 Literatura

- 1 Douša M.: Stanovení nízkých obsahů nifursolu v krmivech metodou HPLC, Bulletin 2003 laboratorního odboru roč. VII, č. 1, str. 27, LO ÚKZÚZ Brno, 2003 (ISSN 1212-5466).