

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Laboratorní odbor



Bulletin 2003

Ročník VII, číslo 1/2003

Brno 2003

Obsah

1.	Stanovení obsahu nikarbazinu v krmivech metodou HPLC.....	1
	(Michal Douša, ÚKZÚZ, regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň, Lýdie Dudíková, Kateřina Boudová, Alena Breburdová, Danuše Nenáhlová, ÚKZÚZ, regionální laboratorní oddělení Praha, Za Opravnou 4, 150 06 Praha 5 - Motol)	
2.	Stanovení nízkých obsahů robenidinu v krmivech metodou HPLC.....	13
	(Michal Douša, ÚKZÚZ, regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň)	
3.	Stanovení obsahu nifursolu v krmivech metodou HPLC.....	26
	(Michal Douša, ÚKZÚZ, regionální laboratorní oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň)	

Za obsah příspěvků odpovídá autor.

Plné znění všech Bulletinů (včetně barevných grafů a obrázků) můžete najít na našich webových stránkách v části věnované laboratornímu odboru (<http://www.ukzuz.cz>).

Bulletin laboratorního odboru VII 2003/1

Ročník: VII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2003

Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral

Technická spolupráce: Ing. Eliška Matějová

Náklad: 120 výtisků

Počet stran: 40

Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111

e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou

ISSN 1212-5466

Stanovení obsahu nikarbazuinu v krmivech metodou HPLC

Michal Douša^a,

Lýdie Dudíková^b, Kateřina Boudová^b, Alena Breburdová^b, Danuše Nenáhlová^b,

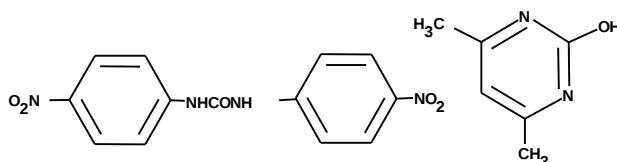
^a Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, regionální laboratorní oddělení
Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň

^b Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Regionální laboratorní
oddělení Praha, Za opravnou 4, 150 06 Praha 5 - Motol, e-mail:

lydie.dudikova@ukzuz.cz

1. Úvod

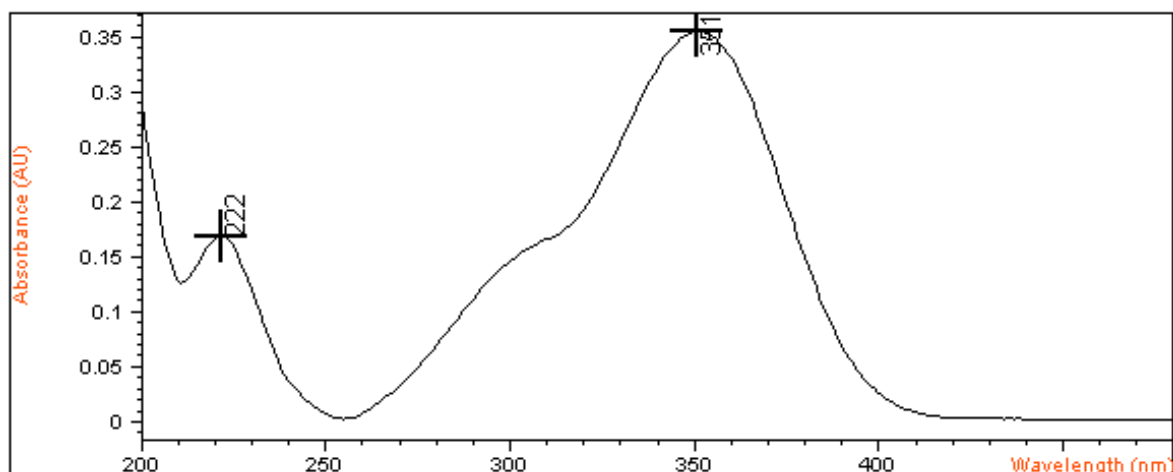
Nikarbazin (nicarb, nicoxin, nicrazin, obr. 1) se používá v kombinaci s narasinem jako účinné antikokcidikum řádově v obsazích 40 – 50 mg/kg finálního krmiva¹. Jeho aktivita jako antikokcidika byla již popsána.



Obr. 1: Strukturní vzorec nikarbazuinu

2. Chemické a fyzikální vlastnosti

Nikarbazin je ekvimolární komplex 1,3-bis-(4-nitrofenyl) močoviny a 4,6-dimethylpyrimidin-2-olu, CAS = [330-95-0], sumárního vzorce $C_{19}H_{18}N_6O_6$ o molekulové hmotnosti $426,38 \text{ g.mol}^{-1}$. Absorpční maximum je $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$ (H_2SO_4), $\lambda_{\text{max}} = 351 \text{ nm}$ (acetonitril – voda; obr. 2), teplota tání $265\text{--}275^\circ\text{C}$, nerozpustný ve vodě, rozpustný v kyselinách. Suché krystaly jsou velmi silně elektrostatické a velmi obtížně mísitelné.



Obr. 2: Absorpční spektrum nikarbazu v roztoku acetonitril – voda, c = 8 mg/l.

3. Literární rešerše

Pro stanovení nikarbazu v krmivech byla doporučena sdružením Association of Official Analytical Chemists (AOAC) v roce 1970 spektrofotometrická metoda, po předchozí chromatografii na oxidu hlinitém a je platná dodnes². Po extrakci nikarbazu dimethylformamidem se extrakt přečistí na neutrálním oxidu hlinitém (promývací systém – dimethylformamid, eluční systém - ethanol). Přečištěný extrakt se naředí alkoholickým roztokem hydroxidu sodného, absorpční maximum je 344 nm. Nitrofurazon, furazolidon a další nitroderiváty dávají pozitivní chyby. Všechny operace s roztoky nikarbazu musí být prováděny za nepřístupu denního světla.

Polarografická metoda stanovení v premixech byla popsána Kvapilem³. Nikarbazin dává katodickou vlnu v alkalickém prostředí acetonu (aceton - 1M NaOH) s půlvlnným potenciálem $E_{1/2} = -0,930$ V (proti SKE). Ke zvýšení citlivosti metody a snížení meze stanovitelnosti byly využity techniky diferenční pulsní polarografie.^{4,5}

Všechny nevýhody předchozích metod stanovení byly odstraněny zavedením HPLC metod stanovení a to nejprve ve zvířecích tkáních a produktech^{6,7} později i s použitím LC-MS⁸. Porovnání metody pulsní polarografie a metody HPLC bylo provedeno Knuppem a spolupracovníky⁹. Acetonitrilový extrakt ze zvířecích tkání a vajíček byl podroben analýze oběma metodami, jejichž výsledky byly porovnány. Polarografická metoda poskytuje detekční limit 50 µg/kg a výtěžnost metody 79 %. HPLC metoda s elektrochemickou detekcí s limitem detekce 1 µg/kg, vyhodnocení se provádí na základě vnitřního standardu nifursolu. Obě metody poskytují výsledky v dobré shodě.

Metoda HPLC stanovení nikarbazuinu v krmivech a premixech byla poprvé popsána v roce 1987¹⁰. Nikarbazin se extrahuje 15 minut dimethylformamidem při 100°C, extrakt se po odstředění analyzuje na reverzní fázi C18 (Bondapak C18) za použití mobilní fáze methanol – voda (7+3) s UV detekcí $\lambda = 365$ nm. Byla popsána i metoda stanovení nikarbazuinu pro nízké obsahy řádově v $\mu\text{g/kg}$.¹¹ Nikarbazin je extrahován acetonitrilem a extrakt je přečištěn na bazickém oxidu hlinitém a poté je extrakt analyzován na reverzní fázi (Wakosil 5C18-200) s mobilní fází acetonitril – voda (1+1). Výtěžnost metody pro obsahy od 0,1 do 1,0 $\mu\text{g/kg}$ je 104,8 % (směrodatná odchylka 5,0 %). Byla popsána rovněž mikro-HPLC metoda stanovení nikarbazuinu v kuřecích tkáních, vajíčkách, krmivech pro brojlerů a kuřecích výkalech.¹² Metoda je poměrně univerzální – nikarbazin se extrahuje opakovaně acetonitrilem a poté se nikarbazin reextrahuje do dichlormethanu v přítomnosti pevného chloridu sodného. Organická fáze dichlormethanu se vysuší přefiltrováním přes vrstvu bezvodého síranu sodného a extrakt je odpařen za vakua k suchu při teplotě 45 - 50°C. Odparek se převede do centrifugační zkumavky, rozpustí se ve 2 ml roztoku methanol-acetonitril - voda (5+3+2), přidá se 1 ml hexanu a 4krát 1 ml acetonitrilu a opět se odpaří k suchu při teplotě 50° C proudem dusíku. Odparek se opět rozpustí ve 2 ml směsi methanol-acetonitril - voda (5+3+2), přidá se 0,5 ml hexanu a extrakt se odstředí a k analýze se použije vodná fáze. Analyzuje se na reverzní fázi C18 (Supelcosil LC-18, 300x1,0 mm) za použití mobilní fáze acetonitril + 0,1 M octanový pufr pH 4,8 (7+3) při průtoku 0,03 ml/min s UV detekcí při $\lambda = 340$ nm. Výtěžnost metody je 76,8-95,9% a detekční limit je 25 pg/kg.

Ke stanovení residuů nikarbazuinu v krmivech, vajíčkách a tkáních byla použita také superkritická fluidní extrakce¹³ oxidem uhličitým při teplotě 85°C a tlaku 28 MPa. Extrakt byl analyzován na reverzní fázi (APEX ODS) za použití mobilní fáze acetonitril – voda (55+45) s UV detekcí $\lambda = 344$ nm. Mez stanovitelnosti je 0,4 mg/kg a výtěžnost metody 93 – 110 %. Velice jednoduchá metoda stanovení nikarbazuinu v krmivech bez přečištění matrice byla popsána v roce 2000 (cit.¹⁴). Nikarbazin byl extrahován extrakčním roztokem acetonitril – voda (4+1) a extrakt byl po filtraci přímo analyzován na reverzní fázi C18 s UV detekcí při $\lambda = 340$ nm. Detekční limit je 0,25 mg/kg a mez stanovitelnosti je 0,5 mg/kg. Výtěžnost metody se pohybuje v rozmezí od 95,2 do 101,8 %.

Byla rovněž vyvinuta a testována velmi rychlá simultánní metoda stanovení clopidolu a nikarbazuinu v krmivech.¹⁵ Obě kokcidiostatika jsou extrahována vodným dimethylformamidem a takto získaný extrakt je přečištěn technikou SPE na bazickém oxidu hlinitém. Eluát je pak přímo analyzován na reverzní fázi C18 za použití mobilní fáze acetonitril – 0 mM acetátový pufr pH 4,6 s UV detekcí při $\lambda = 265$ nm pro clopidol a $\lambda = 345$ nm

pro nikarbazin. Výtěžnost metody je pro nikarbazin 95 % pro rozsah obsahu 2 až 150 mg/kg. Výtěžnost metody je pro clopidol 98 % pro rozsah obsahu 5 až 150 mg/kg. Mez stanovitelnosti je 2 mg/kg pro nikarbazin a 5 mg/kg pro clopidol.

4. Experimentální část

4.1 Princip metody

Nikarbazin se extrahuje směsným rozpouštědlem acetonitril - voda. Extrakt se přímo použije k analýze na reverzní fázi C18 s UV detekcí při $\lambda = 351 \text{ nm}$.

4.2 Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z 230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, který se skládá z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), spektrofotometrického detektoru W486 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq nebo na chromatografu, který se skládá z vysokotlaké pumpy Costametric 3500 (LDC Analytical-Watrex), detektoru diode array SpectroMonitor 5000 (LDC Analytical-Watrex), autosampleru Hewlett Packard 1100 a datastanice PC 1000. K separaci byla použita chromatografická kolona Symmetry Shield C18, 5 μm , 3,0 x 150 mm (Waters, Milford, USA), nebo XTerra RP18, 5 μm , 3,9 x 150 mm (Waters, Milford, USA).

4.3 Chemikálie

Acetonitril HPLC grade (J.T. Baker, USA) a acetonitril p.a. (FLUKA, Švýcarsko). Extrakční roztok byl připraven smísením 800 ml acetonitrilu a 200 ml vody. Mobilní fáze k separaci nikarbazinu na analytické koloně byla připravena smísením 570 ml acetonitrilu a 430 ml demineralizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA). Kalibrační roztoky o koncentraci 2,0; 4,0; 8,0 a 20,0 mg.l^{-1} byly připraveny postupným ředěním základního roztoku nikarbazinu (Eli Lilly, USA) v methanolu o koncentraci 200 mg.l^{-1} mobilní fází.

4.4 Výběr vzorků

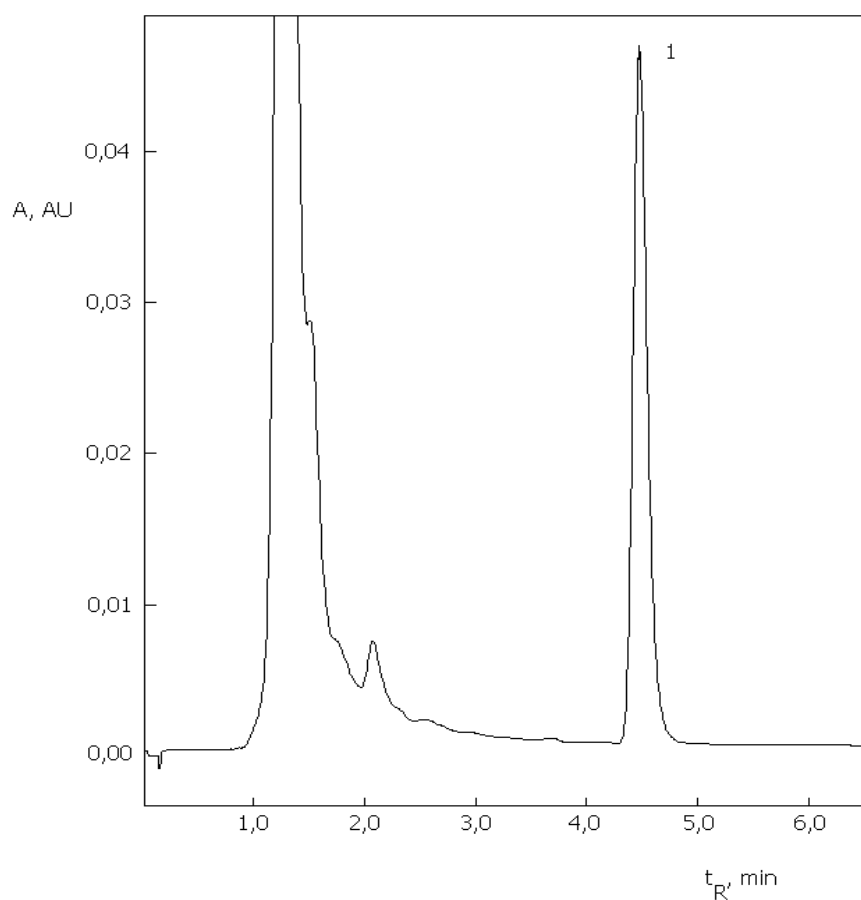
Analýzy byly prováděny na reálných vzorcích finálních krmiv odebraných v rámci státního odborného dozoru, zákon o krmivech §16 a §17 (cit.¹⁶) a na modelových vzorcích krmiv s přísávkem nikarbazinu. Všechny vzorky se upravily homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku.

4.5 Pracovní postup

2 až 20 g zkušebního vzorku se extrahuje 100 až 200 ml extrakční směsí 60 minut v 500 ml Erlenmayerově baňce na laboratorní třepačce a pak 10 minut na ultrazvukové lázni. Takto získaný extrakt se po odstředění při 5 000 ot./min použije přímo k analýze na chromatografické koloně. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Chromatogram separace je ukázán na obr. 3.

Tabulka č. 1 - HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	XTerra RP18, 5 µm, 3,9 x 150 mm nebo Symmetry C18, 5 µm, 3,0 x 150 mm
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Teplota kolony	okolí
Objem nástríku	10 µl
Detektor UV	351 nm



Obr. 3: Separace nikarbazinu na chromatografické koloně Symmetry C18. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce č.1. Krmná směs pro brojler, obsah nikarbazinu 40 mg/kg. Separační charakteristiky: $N = 6\,285$, $k = 1,70$, $t_a = 1,31$, $T = 40\,^{\circ}\text{C}$.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Volba kalibračního modelu

Při lineární kalibraci byla testována volba vhodného kalibračního modelu a výpočet odhadu jeho parametrů a výpočet směrodatné odchylky. Při výpočtu hodnot koeficientů a , b se vycházelo z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny hodnoty závisle proměnné - použití metody nejmenších čtverců. Byly vypočteny hodnoty koeficientů $a = 4\,083,4$ (směrodatná odchylka 28,81) a $b = 57\,831$ (směrodatná odchylka 261,9) pro hladinu významnosti $P = 0,95$. Korelační koeficient $r = 0,99998$.

Směrodatná odchylka s_{yx} , která charakterizuje rozptýlení kolem regresní přímky, byla vypočtena $s_{yx} = 3\,657,0$.

Porovnání odhadů koeficientů a , b se skutečnými hodnotami parametrů a , b , bylo provedeno použitím Studentova t-testu při testování pro $a = 0$ a $b = 1$. Vypočtené t-hodnoty Studentova rozdělení jsou pro $t_a = 1,417$ a $t_b = 220,8$. Protože $t_a < t(P = 0,95; f = 4,303)$ je rozdíl koeficientu a od nuly statisticky nevýznamný a může předpokládat závislost typu $y = b_0x$. Testováním regresního koeficientu b proti očekávané hodnotě $b = 1$ platí

$t_b > t(P = 0,95; f = 4,303)$ a $b \neq 1$.

Vypočtené hodnoty b_0 závislosti typu $y = b_0x$, směrodatná odchylka s_{yx}' , která charakterizuje rozptýlení kolem regresní přímky pro předpoklad $a = 0$ a testování rozptylů obou koeficientů b pomocí F-testu jsou následující: $b_0 = 58\,118,2$, $s_{yx}' = 4\,227,7$ a $F = 7\,347$. Pro kalibrační přímku platí, že $F > F(v_1 = 1, v_2 = m-2; 18,513)$ a platí závislost typu $y = a + bx$.

5.2 Přesnost a shodnost

Vzhledem k tomu, že nejsou dostupné certifikované referenční materiály, byla přesnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Správnost byla dále zjišťována testem výtěžnosti, kdy k přesné navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky bylo postupně přidáváno různé množství čisté látky (ve třech různých hladinách přídatku – 40, 80 a 120 %) a zpětně vypočítaná výtěžnost. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 3 krát. Výsledky a vypočtené statistické parametry jsou uvedeny v tabulce č. 2. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 100,0 až 220,0 mg.kg⁻¹ je $(101,8 \pm 4,2)$ %. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí t-testu.

Shodnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která

byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků krmiv, jejichž celkový počet byl 8. Opakovatelnost analytické metody vypočtené pomocí programu Effi Validation 3.0¹⁷ je 0,7646 jednotek, tj. 0,74 % relativních pro obsahy obsahy 100,0 až 220,0 mg/kg nikarbazuinu. S použitím Cochranova testu nebyla nalezena úroveň, na které je rozptyl měření větší, než na ostatních úrovních.

Tabulka č. 2 – ověření výtěžnosti nikarbazuinu

Deklarovaná hodnota (mg/kg)	Naměřená hodnota (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přídavek (mg/kg)	Interval spolehlivosti (mg/kg)
140,57	142,77	101,6	37,092	36,1922 – 39,8084
140,57	140,91	100,2		
140,57	140,76	100,1		
181,14	183,24	101,2	77,662	75,4199 – 85,5575
181,14	181,24	100,1		
181,14	187,43	103,5		
221,72	235,07	106,0	118,242	115,1480 – 135,9600
221,72	229,88	103,7		
221,72	222,16	99,8		

5.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez $(1-\alpha)\%$ ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá hodnotě 0,1 (cit.¹⁸). Mez detekce má hodnotu $0,69 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. pro standardní operační proceduru $3,46 \text{ mg.kg}^{-1}$ a mez stanovitelnosti má hodnotu $0,73 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. pro standardní operační proceduru $3,67 \text{ mg.kg}^{-1}$.

5.4 Optimalizace mobilní fáze

Mobilní fáze byly optimalizovány tak, aby retenční faktor byl $k \geq 1,5$, počet teoretických pater $N \geq 5\,000$ a asymetrický faktor $t_a \leq 1,4$. V mobilní fázi byl sledován vliv koncentrace organického rozpouštědla na retenční faktor. Vliv koncentrace organického rozpouštědla ϕ v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky k byl popsán rovnicí:¹⁹

$$k = k_a 10^{-mj}$$

kde retenční faktor k_a je retenční faktor v čisté vodě jako eluentu, získaný extrapolací experimentálních údajů a m je parametr přímo závislý na síle organického solventu a povaze solutu. V logaritmické formě přejde rovnice na tvar

$$\log k = \log k_a - mj$$

a logaritmy retenčních faktorů klesají s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Experimentálně byla zjištěna lineární závislost mezi koncentrací acetonitrilu (v koncentračním rozmezí $j = 0,56$ až $0,66$) a logaritmem retenčního faktoru (obr. 4) a rovnice pro mobilní fázi má tvar

$$\log k = 2,2993 - 3,4325j$$

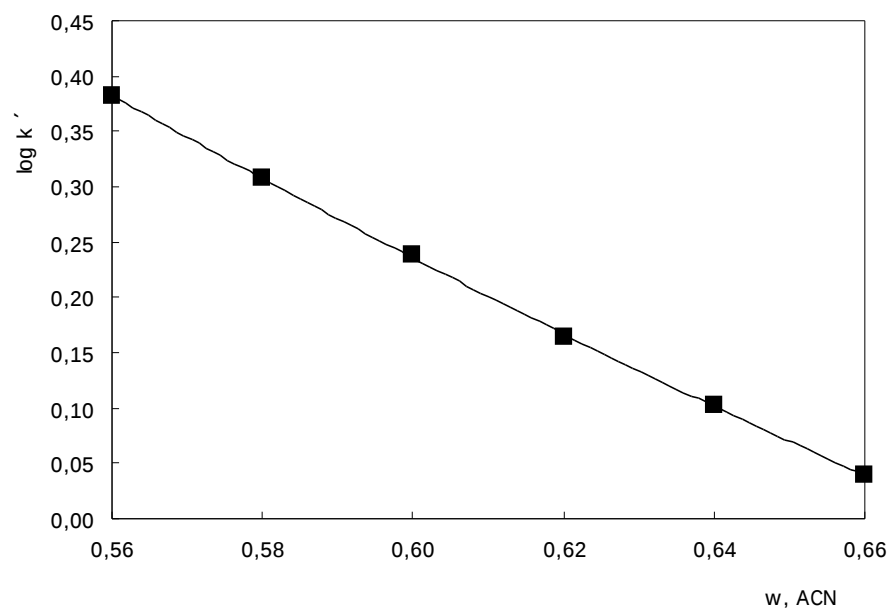
korelační koeficient $r = -0,9993$.

Retence solutu s rostoucí teplotou klesá a $\log k$ je lineární funkcí převrácené hodnoty teploty T . Tento závěr odpovídá obecnému tvaru van't Hoffových závislostí pro chromatografický proces^{20,21}:

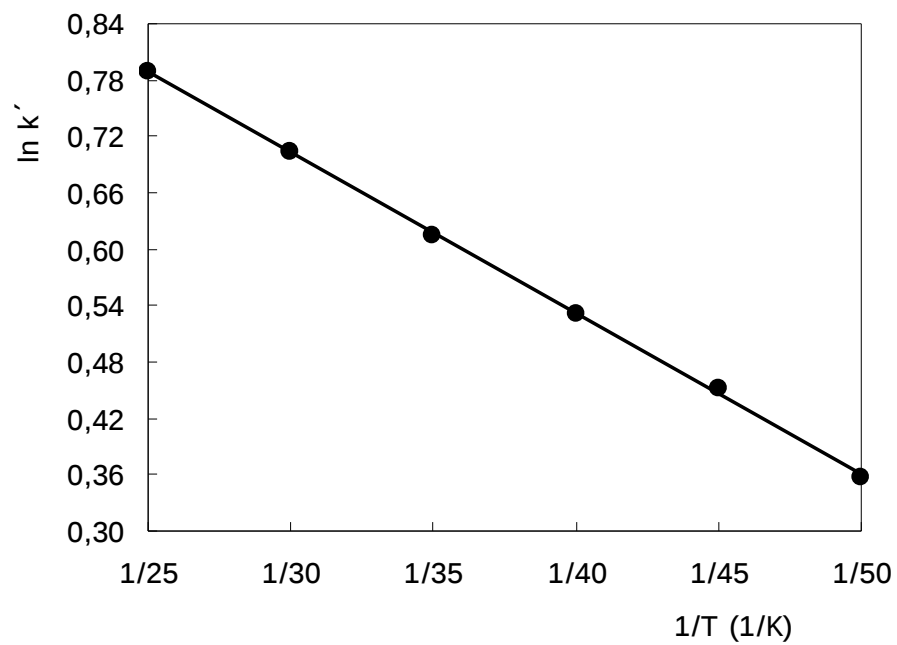
$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \frac{V_s}{V_M} = A + \frac{B}{T}$$

kde ΔH° , ΔS° jsou entalpie a entropie solutu v daném chromatografickém systému,

R je plynová konstanta a A , B jsou konstanty závislé na chromatografickém systému. Experimentální závislosti jsou v dobré shodě s těmito závěry (obr. 5) a ze závislosti byly vypočteny konstanty $A = -4,7327$, $B = 1\,646,6$ s korelačním koeficientem $r = 0,9995$ (pro teplotní rozsah 25 až 50 °C).



Obr. 4: Závislost logaritmu kapacitního poměru k na koncentraci acetonitrilu v mobilní fázi



Obr. 5: Teplotní závislost logaritmu kapacitního poměru.

6. Revalidace metody

6.1 Stabilita standardu

Základní roztok standardu nikarbazinu je nutné připravovat vždy čerstvý.

Kriteria pro revalidaci systému – limity pro přijetí metody

- 4 výtěžnost metody pro obsah 40 mg/kg > 95 % (ověření extrakce).
- 4 účinnost kolony musí vyhovovat parametrům: $N \geq 5\,000$, $k \geq 1,5$ a $t_a \leq 1,4$ (úprava mobilní fáze, změna kolony).
- 4 mez stanovitelnosti (vypočtená z kalibrační přímky) musí ležet v intervalu (0,7 -1,0) mg/l.

7. Literatura

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. „AOAC Official Method 956.11 Nicarbazin in Feeds“, v knize: „Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists“, Cunniff P. Editor, kap. 5, str. 15, 16 vyd., AOAC, Arlington, Virginia 1995.
3. Kvapil J.: Czech. Patent 146, 496 (1971).
4. Wood J.S., Downing G.V.: J. Agric. Food Chem. 28, 452 (1980).
5. Machielli R.F., Downing G.V.: J. Agric. Food Chem. 22, 449 (1974).
6. Takahashi M., Yoshida A.: Iwate-ken Eisei kenkyusho Nenpo 26, 82 (1983).
7. Malisch R.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 183, 253 (1986).
8. Blanchflower W.J., Hughes P.J., Kennedy D.G.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 80(6), 1177 (1997).
9. Knupp G., Kreickmann G.B., Commichau C., Schmidt T., Büning-Pfaue H.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. 185, 472 (1987).
10. Koyama N., Shimada H.: Chikusan no Kenkyu 41(5), 589 (1987) (CA: 107:114350).
11. Ishibashi T.: Shiryō Kenkyū Hokoku 19, 100 (1994) (CA: 121:254024).
12. Draisci R., Lucentini L., Boria P., Lucarelli C.: J. Chromatogr., A 697(1-2), 407 (1995).
13. Matabudul D.K., Crosby N.T., Sumar S.: Analyst 124(4), 499 (1999).
14. Krabel B.J., Dickson D.A., Zimmerman A.G., Coleman M.R.: J.Assoc.Off.Anal. Chem. Int. 83(5), 1027 (2000).
15. Dusi G., Faggionato E., Gamba V., Baiguera A.: J. Chromatogr., A 882(1-2), 79 (2000).
16. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech ve znění pozdějších předpisů.
17. Příručka Effi Validation 3.0, EffiChem, Oulehla 496, 67971 Lysice (1999-2002)
18. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači, FINISH, Pardubice 1992.
19. Berendsen G.E., Galan L.: J. Chromatogr. 196, 21 (1980).
20. Colin H., Guiochon G.: J. Chromatogr. 158, 183 (1978).
21. Jinno K., Ozaki N.: J. Liquid Chromatogr. 7, 877 (1984).

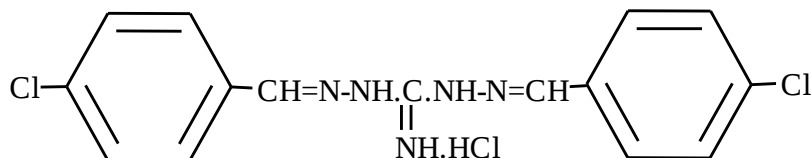
Stanovení nízkých obsahů robenidinu v krmivech metodou HPLC

Michal Douša

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský; Regionální laboratorní oddělení Plzeň,
Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň,

Úvod

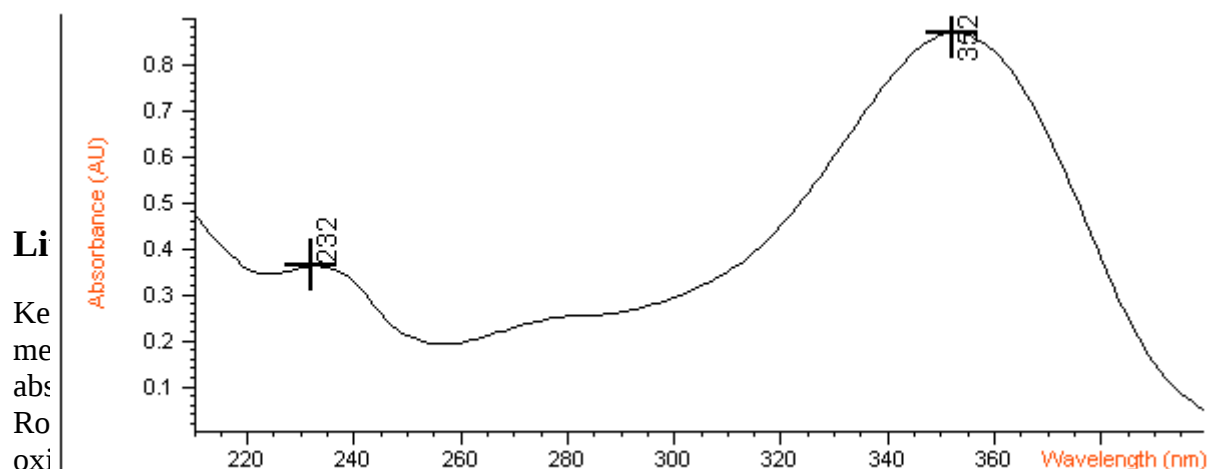
Robenidin (obr.1), 1,3-bis-(p-chlorbenzilidenamino)guanidin hydrochlorid, se používá jako účinné antikokcidikum ve výkrmu kuřat a krůťat a odchovu kuřic a bažantů řádově v obsazích 30 až 66 mg/kg finálního krmivaⁱ a ochranná lhůta je 5 dnů. Jeho aktivita jako antikokcidika byla již popsánaⁱⁱ.



Obr. 1: Strukturní vzorec robenidinu

Chemické a fyzikální vlastnosti

Robenidin je po chemické stránce derivátem guanidinu (1,3-bis-(p-chlorbenzilidenamino)-guanidin hydrochlorid), CAS = [25875-51-8], sumárního vzorce $C_{15}H_{14}Cl_3N_5$ o molekulové hmotnosti 370,67 g/mol. Absorpční maximu je $\lambda_1=232$, $\lambda_2=352$ nm (obr. 2).



550 nm a při stejné vlnové délce v prostředí kyseliny trichloroctové. Výsledná absorbance je vypočtena z rovnice $A = A_{\text{KOH440}} - A_{\text{KOH550}} - (A_{\text{TCA440}} - A_{\text{TCA550}})$ a obsah robenidinu se vypočte z kalibrační křivky. Jednoduchou spektrofotometrickou metodu stanovení, založenou na podobném principu, popsal Bories^{iv}. Po extrakci robenidinu kyselým acetoneem je extrakt přečištěn na tenké vrstvě silikagelu v chromatografickém systému chloroform-methanol (95+5). Skvrna robenidinu je identifikována UV světlem při 265 nm ($R_F = 0,75$), skvrna je přenesena do definovaného objemu dimethylformamidu a po přidavku 0,1 ml 1 mol.l⁻¹ NaOH je po 15 minutách změřena intensita žlutého zbarvení při 464 nm. Hodnota molárního absorpčního koeficientu $\epsilon = 7,6 \cdot 10^4$. Výtěžnost metody byla vypočtena na 92-100 % a směrodatná odchylka na 4,4 %. Spektrofotometrické metody nejsou příliš specifické a citlivé a proto se používají především metody HPLC. Automatizovanou HPLC metodu stanovení robenidinu publikovali Zagar a spol.^v Chromatografický systém používá jako mobilní fázi o složení methanol + kyselina octová + dichlormethan (90 + 10 + 900) a stacionární fázi silikagel. Extrakce robenidinu je uskutečňována dvěma způsoby. První způsob využívá manuální extrakce robenidinu ze vzorku methanolem a po naředění roztokem kyselina octová-dichlormethan (10 + 990) je analyzován. Druhý způsob využívá automatické extrakční jednotky SolidPrep II spojené on-line s chromatografickým systémem. Kapacita tohoto systému je asi 10 vzorků/hodinu. Separace probíhá na chromatografické koloně při průtoku mobilní fáze 1 ml/min a UV detekci při 280 nm. Průměrná hodnota výtěžnosti byla vypočtena na 101,4 %. Nevýhodou metody je vysoká mez stanovitelnosti z důvodu nízké citlivosti použité UV detekce při vlnové délce 280 nm. Vhodnější vlnová délka UV detekce je při 352 nm^{vi}. Robenidin je extrahován z navážky 10 g vzorku 100 ml chloroformu, po předchozím

smísení navážky s 1 g fosforečnanu sodného a 2 ml vody, 20 minut. Po extrakci se odpipetuje 20 ml extraktu, který se odpaří k suchu a odparek se rozpustí ve 100 ml acetonitrilu. Takto připravený extrakt se dávkuje na chromatografickou kolonu a robenidin se separuje na reverzní fázi C18 za použití mobilní fáze acetonitril + voda + 25 mM-KH₂PO₄ (72,5 + 22,5 + 5) o průtoku 1,5 ml/min a UV detekci při 352 nm. Výtěžnost robenidinu v závislosti na druhu vzorku se pohybuje v poměrně širokém rozmezí 57,1 až 97,7 %. HPLC metody s UV detekcí jsou poměrně málo citlivé a selektivní a proto byla publikována HPLC metoda stanovení robenidinu s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizaci robenidinu dansylchloridem. Vzniklý derivát je separován na silikagelu za použití mobilní fáze chloroform + hexan + tetrahydrofuran + methanol (50 + 50 + 2 + 1) při průtoku 2 ml/min s fluorescenční detekcí při 485 nm s excitační vlnovou délkou 320 nm^{vii}. Výtěžnost byla vypočtena na 96,6 % se směrodatnou odchylkou 1,26 % (pro počet opakování 4). Mez detekce je 0,4 mg/l (8 ng při objemu nástriku 20 µl).

Na základě požadavků zákona o krmivech §7 (cit.^{viii}) Ministerstvo zemědělství České republiky ukládá monitorování výskytu nežádoucích doplňkových látek, mezi které robenidin patří, u výrobků krmiv uváděných do oběhu. V souladu s koncepcí pro monitorování nežádoucích doplňkových látek bylo proto nutno vyvinout rychlou a spolehlivou analytickou metodu, která by byla dostatečně selektivní a citlivá pro koncentrační hladiny robenidinu řádově v µg/kg.

Experimentální část

Princip metody

Robenidin se extrahuje směsným rozpouštědlem ethylester kyseliny octové – dichlormethan. Extrakt se přečistí na pevné fázi silikagelu a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu mobilní fáze. Robenidin se stanoví na reverzní fázi C18 s iontovými páry a UV detekcí při 314 nm.

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepače LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Přečištění extraktu bylo provedeno na separační jednotce BAKER spe 12G System (J.T. Baker, USA) na kolonkách Sep-Pak Plus Cartridges Silica (Waters, Milford, USA). Zakoncentrování extraktu bylo provedeno na koncentrátoru vzorků Termovap (ECOM, Česká republika). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Hermle Z

230 MR (Hermle, Gosheim, SRN). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, který se skládá z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), spektrofotometrického detektoru W486 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. K separaci byla použita chromatografická kolona XTerra RP18, 4 μm , 3,0 x 150 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoků bylo měřeno na pH-metru pH 526 (WTW, SRN) s kombinovanou skleněnou elektrodou a pH-metr byl kalibrován na ftalátový pufr CertiPUR pH 4,01 a borátový pufr pH 9,18 (MERCK, SRN).

Chemikálie

Methanol HPLC grade (J.T. Baker, USA), dichlormethan HPLC grade (J.T. Baker, USA), acetonitril (J.T. Baker, USA) sodná sůl kyseliny 1-hexansulfonové čistoty 98+ % (Sigma-Aldrich, USA), triethylamin p.a. (FLUKA, Švýcarsko), ethylester kyseliny octové p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika). Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), kyselina chlorovodíková a kyselina fosforečná čistoty UltraPure (MERCK, SRN). Extrakční roztok byl připraven smísením 200 ml ethylesteru kyseliny octové a 800 ml dichlormethanu. K extrakci na pevné fázi bylo použito promývací činidlo, které bylo připraveno smísením 10 ml ethylesteru kyseliny octové a 90 ml dichlormethanu a eluční činidlo, které bylo připraveno smísením 12 ml methanolu a 88 ml dichlormethanu.

Mobilní fáze I k separaci robenidinu na analytické koloně byla připravena smísením 660 ml methanolu, 334 ml demineralizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA), 4 ml kyseliny fosforečné a 2 ml triethylaminu. V takto připravené mobilní fázi se rozpustí 1,8822 g sodné soli kyseliny 1-hexansulfonové ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$) a pH mobilní fáze se upraví triethylaminem na hodnotu pH 3,5. Mobilní fáze II k separaci robenidinu na analytické koloně byla připravena smísením 640 ml acetonitrilu a 360 ml 50 mM roztoku TRIS. pH takto připravené mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu pH 9,0 kyselinou chlorovodíkovou. Mobilní fáze III k separaci robenidinu na analytické koloně byla připravena smísením 420 ml acetonitrilu, 574 ml demineralizované vody, 4 ml kyseliny fosforečné a 2 ml triethylaminu. V takto připravené mobilní fázi se rozpustí 1,8822 g sodné soli kyseliny 1-hexansulfonové ($0,010 \text{ mol.l}^{-1}$) a pH mobilní fáze se upraví triethylaminem na hodnotu pH 3,5.

Kalibrační roztoky o koncentraci 1,0; 2,0; 4,0 a 10,0 mg.l^{-1} byly připraveny postupným ředěním základního roztoku robenidinu (Röthel, SRN) v methanolu o koncentraci 50 mg.l^{-1} mobilní fázi.

Výběr vzorků

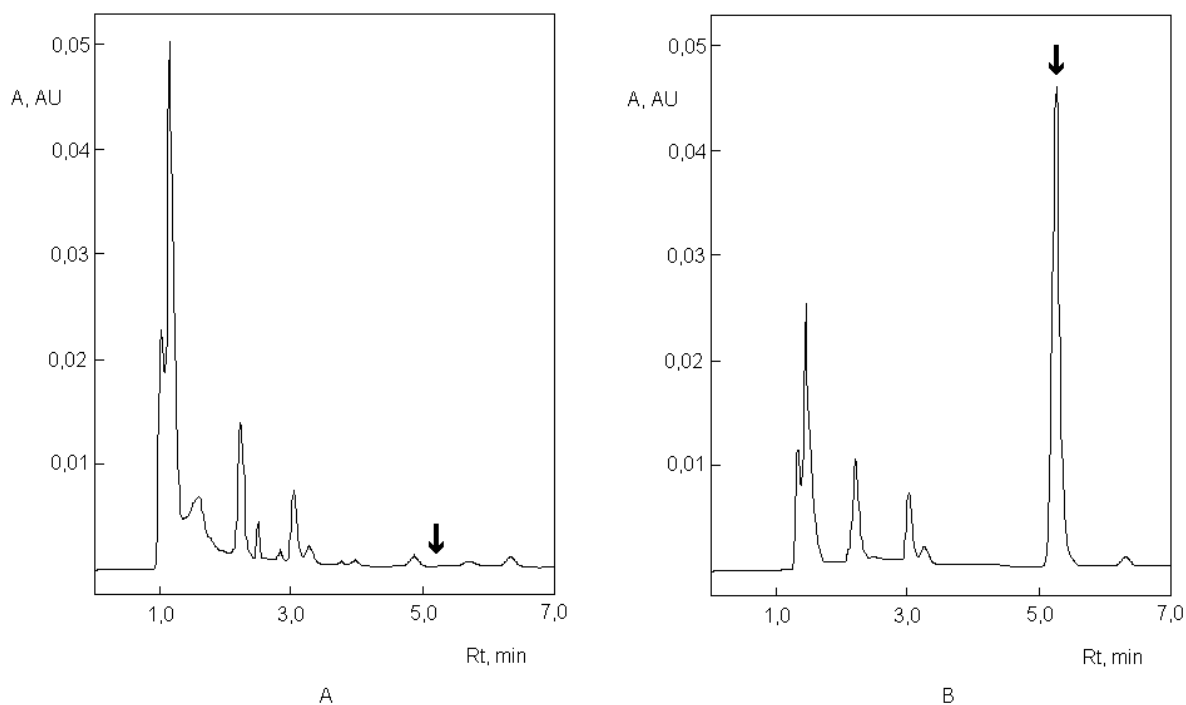
Analýzy byly prováděny na reálných vzorcích finálních krmiv odebraných v rámci státního odborného dozoru, zákon o krmivech §16 a §17(cit. ^{viii}) a na modelových vzorcích krmiv o složení: 45 % pšenice, 15 % ječmen, 12 % sojový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % krevní šrot, 5 % úsušky píce, 4 % vápenec a 1 % premix minerálních látek a vitaminů s přídavkem robenidinu o koncentrační hladině 0,4; 0,8; 1,6; 4,0 a 8,0 mg.kg⁻¹. Dále byly připraveny modelové vzorky robenidinu o koncentrační hladině 2 a 4 mg/kg naředěním a homogenizací krmné směsi pro brojlerů o obsahu robenidinu 60 mg/kg (Doagra a.s., Domažlice) pšeničnou krmnou moukou. Tyto připravené vzorky byly použity k mezilaboratorním porovnávacím zkouškám. Všechny vzorky se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku.

Pracovní postup

45 g zkušební vzorku se extrahuje 150 ml extrakční směsí 30 minut v 500 ml kónické baňce na laboratorní třepačce a pak 2 minuty na ultrazvukové lázni. Takto získaný extrakt se přečistí preseparací na pevné fázi silikagelu.

Přečištění extraktu extrakcí na pevné fázi

Na kolonku Sep-Pak Plus Silica, kondicionovanou 4 ml promývacího činidla, se odměří 10,0 ml přefiltrovaného extraktu. Kolonka se promyje 2 krát 3 ml promývacího činidla a robenidin se eluuje 8 ml elučního činidla do vialky na 10 ml. Eluát se odpaří pod proudem dusíku k suchu při teplotě 50 °C. Odparek se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze na ultrazvukové lázni (1 minutu), promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Takto připravený extrakt se odstředí 5 minut při 10 000 ot.min⁻¹ a dává se na chromatografickou kolonu. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I. Chromatogram separace je ukázán na obr. 3.



Obr. 3: Chromatogram separace robenidinu. Slepý pokus modelového vzorku bez přídavku robenidinu (A), modelový vzorek (koncentrace robenidinu 4,0 mg/kg) (B). HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka I : HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	XTerra RP18, 4 μ m, 3,0 x 150 mm
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Mobilní fáze	mobilní fáze I
Teplota kolony	okolí
Objem nástřiku	10 μ l
Detektor UV	314 nm

Výsledky a diskuse

Přesnost a shodnost

Vzhledem k tomu, že nejsou dostupné certifikované referenční materiály, byla přesnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 krát. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P=0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 0,4 až 8,0 mg.kg⁻¹ je $(101,2 \pm 6,5) \%$. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty za závisle proměnné. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu $0,0411 \pm 0,3373$ a statisticky se neliší od nuly. Konstanta b regresního vztahu (proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu $0,9976 \pm 0,0832$ a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje přesné výsledky.

Shodnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků krmiv, jejichž celkový počet byl 15. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 0,40 až 4,50 mg/kg má opakovatelnost hodnotu 0,09 mg/kg.

Tabulka II: Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky krmných směsí

Statistické parametry					
Očekávaná hodnota [mg/kg]	0,40	0,80	1,60	3,95	7,96
Nalezená hodnota [mg/kg]	0,41	0,78	1,59	4,23	7,87
Výtěžek metody [%]	100,7	97,8	99,3	107,1	98,9
Interval spolehlivosti	3,1	1,5	2,4	1,1	1,1
Relativní směrodatná odchylka [%]	0,25	1,66	0,25	1,21	1,14

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez $(1-\alpha)\%$ ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá hodnotě 0,1 (cit.^{ix}). Mez detekce má hodnotu $0,38 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. pro standardní operační proceduru $0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$ a mez stanovitelnosti má hodnotu $0,62 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. pro standardní operační proceduru $0,40 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Optimalizace mobilní fáze

Mobilní fáze byly optimalizovány tak, aby retenční faktor byl $k \geq 2,0$, počet teoretických pater $N \geq 5\,000$ a asymetrický faktor $t_a \leq 1,4$. Vypočtené separační charakteristiky u všech tří mobilních fází jsou uvedeny v tabulce III. Ve všech mobilních fázích byl sledován vliv koncentrace organického rozpouštědla a u mobilní fáze I vliv pH mobilní fáze, koncentrace protiiontu a teploty separace na retenční faktor.

Tabulka III: Separační charakteristiky robenidinu pro různé mobilní fáze

Mobilní fáze	t_R (min)	k	N	t_a
I	5,76	3,12	6 100	1,00
II	4,30	2,07	6 300	1,09
III	4,17	2,01	5 500	1,33

Bližší vysvětlení v textu.

Vliv koncentrace organického rozpouštědla ϕ v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky k byl popsán rovnicí:^x

$$k = k_a 10^{-mj}$$

kde retenční faktor k_a je retenční faktor v čisté vodě jako eluentu, získaný extrapolací experimentálních údajů a m je parametr přímo závislý na síle organického solventu a povaze solutu. V logaritmické formě přejde rovnice na tvar

$$\log k = \log k_a - mj$$

a logaritmy retenčních faktorů klesají s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Experimentálně byly zjištěny lineární závislosti mezi koncentrací organického rozpouštědla a logaritmem retenčního faktoru a vypočtené parametry jsou uvedeny v tabulce IV.

Tabulka IV: Vypočtené parametry závislosti koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi na retenční faktory

Mobilní fáze	koncentrační rozsah (j)	k_a	m	r
I	0,55-0,75	19 230	-5,79	-0,9989
II	0,55-0,70	498,1	-3,80	-0,9995
III	0,35-0,50	3 615	-7,23	-0,9980

Bližší vysvětlení v textu.

Při sledování vlivu pH mobilní fáze I (v rozsahu pH 3,0- 5,0) na retenční faktor robenidinu bylo pH mobilní fáze upraveno vždy triethylaminem resp. kyselinou fosforečnou na požadovanou hodnotu pH. Byla zjištěna polynomická závislost 3. řádu mezi pH mobilní fáze a retenčním faktorem. Jako optimální pH mobilní fáze jsme zvolili pH 3,5, které leží v oblasti pH, kdy je změna retence robenidinu nejméně závislá na pH mobilní fáze.

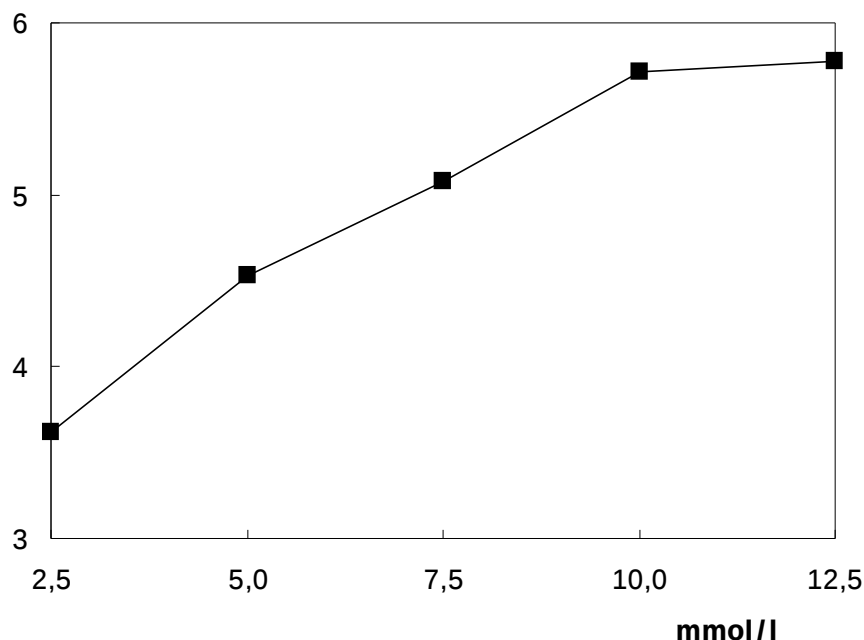
Vliv koncentrace protiiontu na retenční faktor byl sledován pro látkové množství 2,5; 5,0; 7,5; 10 a 12,5 mmol.l⁻¹ sodné soli kyseliny 1-hexansulfonové v mobilní fázi. Podle předpokladu retence robenidinu roste s koncentrací protiiontu (obr. 4). Jako optimální byla zvolena koncentrace 10 mmol.l⁻¹, kdy se retence mění již nejméně.

Retence solutu s rostoucí teplotou klesá a log k je lineární funkcí převrácené hodnoty teploty, T. Tento závěr odpovídá obecnému tvaru van't Hoffových závislostí pro chromatografický proces^{xi,xii}:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \frac{V_s}{V_M} = A + \frac{B}{T}$$

kde ΔH° , ΔS° jsou entalpie a entropie solutu v daném chromatografickém systému, R je plynová konstanta a A, B jsou konstanty závislé na chromatografickém systému. Experimentální závislosti jsou v dobré shodě s těmito závěry a ze závislosti byly vypočteny konstanty A = -6,2639, B = 2397,0 s korelačním koeficientem r = 0,9983.

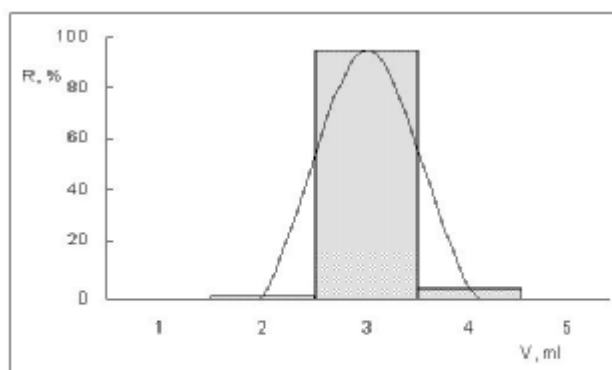
S přihlédnutím k získaným výsledkům byla zvolena mobilní fáze I jako optimální z hlediska selektivity a účinnosti separace. V mobilní fázi II dochází k rozkladu robenidinu z důvodu vyššího pH této mobilní fáze.



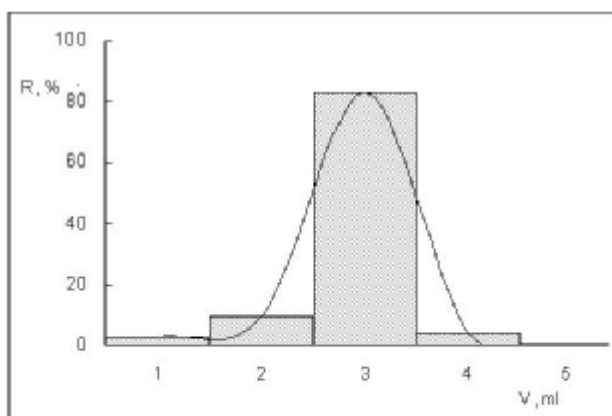
Obr. 4: Vliv koncentrace protiiontu sodné soli 1-hexansulfonové kyseliny v mobilní fázi na retenční faktor robenidinu.

Optimalizace preseparatorace extraktu na pevné fázi

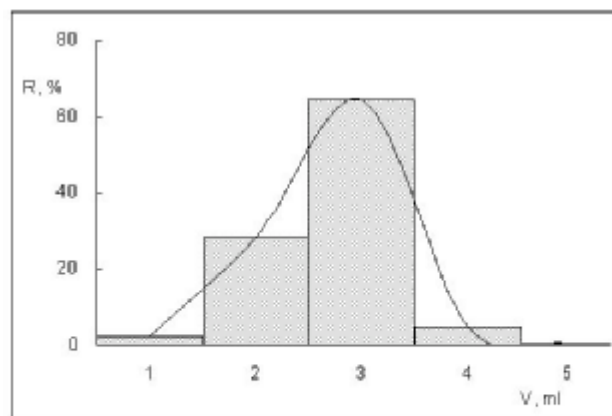
Desorpce robenidinu byla sledována na modelovém roztoku robenidinu v extrakčním roztoku při takové koncentraci, která odpovídala 8 mg/kg robenidinu ve finálním krmivu. Spotřeba desorpčního činidla je patrná z elučního profilu robenidinu z pevné fáze Silica. Měřením bylo zjištěno, že k desorpci robenidinu postačuje 4 ml elučního činidla. Při optimalizaci separace na pevné fázi byl sledován vliv obsahu tuku v krmivu tak, že se k modelovém roztoku robenidinu přidal roztok kafilerního tuku, který odpovídal obsahu tuku 20 a 80 g/kg ve finálním krmivu (obr. 5). Se zvyšujícím se obsahem tuku stoupá spotřeba desorpčního činidla nutná ke kvantitativní desorpci robenidinu až na 5 ml činidla, proto byl zvolen objem 8 ml z důvodu dokonalé desorpce a kvantifikace.



A



B



C

Obr. 5: Eluční profil robenidinu z kolonky Sep Pak Silica (výťažnost R, objem desorpčního činidla V). A – 0 g/kg tuku; B – 20 g/kg tuku; C – 80 g/kg tuku. Bližší vysvětlení v textu.

Revalidace metody

Stabilita standardu

Základní roztok standardu robenidinu je nutné připravovat vždy čerstvý.

Kriteria pro revalidaci systému – limity pro přijetí metody

- 4 výtěžnost metody pro obsah 2 mg/kg > 95 % (ověření extrakce).
- 4 účinnost kolony $N \geq 5\,000$, $k \geq 1,5$ a $t_a \leq 1,4$ (úprava mobilní fáze, změna kolony).
- 4 mez stanovitelnosti (vypočtený z kalibrační přímky) 0,6 mg/l

Literatura

1. Vyhláška č. 194/196 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Kantor S., Kennett R., Waletzki E.: Science 168, 373 (1970)
3. Analyt. Methods Committee, Analyst 100, 668 (1975)
4. Bories G.F.: Analyst 100, 567 (1975)
5. Zagar B. J., Acione P.P., Chrekian G. P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58, 822 (1975)
6. Ramos F., da Silveira I.N.: Bol. Fac. Farm. Coimbra 15, 61 (1991)
7. Cohen H., Armstrong F., Campbell H.: J. Chromatogr. A 694, 407 (1995)
8. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech ve znění pozdějších předpisů
9. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači, FINISH, Pardubice 1992
10. Berendsen G. E., Galan L.: J. Chromatogr. 196, 21 (1980)
11. Colin H., Guichon G.: J. Chromatogr. 158, 183 (1978)
12. Jinno K, Ozaki N.: J. Liquid Chromatogr. 7, 877 (1984)

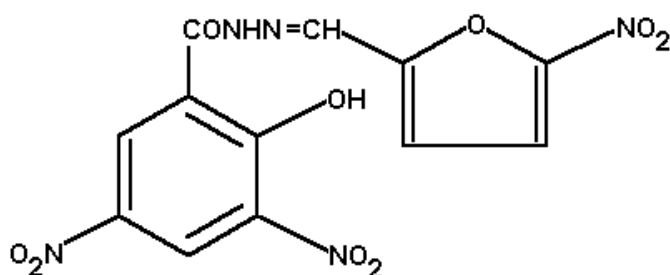
Stanovení obsahu nifursolu v krmivech metodou HPLC

Michal Douša

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský ; Regionální laboratorní oddělení Plzeň,
Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň,

Úvod

Nifursol (obr. 1) je derivát kyseliny 3,5 dinitrosalicylové (3,5-dinitro-2'-(5-nitrofufuryli-den)salicylohydrazid) a používá se k prevenci histaminózy krůt jako chemoterapeutikum a je stimulatorem růstu v dávce kolem 50-75 mg/kg¹



Obr. 1: Strukturní vzorec nifursolu

Chemické a fyzikální vlastnosti

Nifursol je derivát kyseliny 3,5 dinitrosalicylové (3,5-dinitro-2'-(5-nitrofufuryli-den)salicylohydrazid, CAS = [16915-70-1]; (obr.1); sumárního vzorce $C_{12}H_7N_5O_9$ o molekulové hmotnosti 365,21 g/mol). Dobře rozpustný v tetrahydrofuranu, acetonu, acetonitrilu, dimethylformamidu, méně rozpustný ve vodě, nerozpustný v hexanu, etheru. Absorpční maximum 383 nm (rozpouštědlo tetrahydrofuran+voda, 1+1).

Literární rešerše

Podle oficiálních metodik sdružení AOAC se nifursol v krmivech stanoví po extrakci do dimethylformamidu a přečištění extraktu na bazickém oxidu hlinitém spektrofotometricky^{2,3}. Nifursol se detekuje po reakci s fenyldiazinem za vzniku 5-nitrofurfuralfenylhydrazonu. Reakční produkt se extrahuje do toluenu a stanoví se

spektrofotometricky při 555 nm po přidavku hydroxidu hyaminu. Publikované výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky³ stanovení nifursolu dávají průměrnou výtěžnost 101,4 % a směrodatná odchylka dosahuje 7,9 %. Sdružení Analytical Methods Committee doporučuje ke spektrofotometrickému stanovení vlnovou délku 510-515 nm⁴. V této práci jsou publikovány výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky pro tři koncentrační hladiny nifursolu v krmivech – 50, 75 a 100 mg/kg. Průměrná hodnota výtěžnosti se pohybovala od 93 do 96 % a směrodatná odchylka od 3,8 do 4,8 %. Ke stanovení nifursolu v krmivech byla použita rovněž plynová chromatografie⁵. Nifursol se extrahuje acetonitrilem a extrakt se přečistí promýváním sulfidem uhličitým k odstranění interferencí. Molekula nifursolu se hydrolyzuje za vzniku 3,5-dinitrosalicylové kyseliny, která se esterifikuje na methylester kyseliny 3,5-dinitrosalicylové. K detekci se používá detektor elektronového záchytu. Tato metoda je velmi citlivá a specifická, ale vyžaduje předkolonovou derivatizaci a speciální chromatografické podmínky. Za zmínku stojí rovněž polarografická metoda⁶ stanovení nifursolu v krmivech, založená na redukci přítomné nitroskupiny, bohužel metoda je velmi málo specifická.

HPLC metody jsou specifické bez nutnosti derivatizace a poskytující správné výsledky. První HPLC metoda⁷ stanovení nifursolu v krmivech byla publikována v roce 1981. Nifursol je extrahován acetonitrilem při teplotě 70 °C po dobu 45 minut a k odstranění interferencí se používá sulfid uhličitý. Extrakt se analyzuje na chromatografické ionexové koloně (Zipax SAX) s UV detekcí při 365 nm. Jako mobilní fáze se používá 0,4 % vodný chloristan sodný – acetonitril (1+1). Výtěžnost metody se pohybuje pro obsahy od 25 do 100 mg/kg od 103,8 % do 98,1 % a směrodatná odchylka od 4,6 % do 2,8 %. Průměrná hodnota výtěžnosti je 100,6 % a směrodatná odchylka 3,5 %. V metodice sdružení Analytical Methods Committee⁸ je nifursol extrahován acetonitrilem v Soxhletově aparatuře po dobu 3 hodin s 12 cykly za hodinu. Takto připravený extrakt se odpaří za vakua asi na 1/3, potom se naředí mravenčanem amonným (pufr pH 3,5) a analyzuje se na chromatografické koloně C18 (μ-Bondapak) s UV detekcí při 365 nm. Byla porovnána výtěžnost metody pro extrakci dimethylformamidem a acetonitrilem. Oba způsoby extrakce jsou srovnatelné, extrakce dimethylformamidem poskytuje poněkud nižší výsledky, u granulovaných krmiv extrakce dimethylformamidem poskytuje naopak vyšší výsledky. Bylo zjištěno, že granulací dochází zřejmě k rozkladu nifursolu nebo nedokonalé extrakci nifursolu vlivem jeho obdukce během granulace. Mezilaboratorní porovnávací zkoušky se zúčastnilo 7 laboratoří, průměrný výtěžek extrakce je 95 ± 14 % ($P=0,95$). Velmi specifická HPLC metoda stanovení nifursolu v premixech a krmných směsích byla publikována v roce 1994 (cit.⁹). Nifursol je extrahován

tetrahydrofuranem v přítomnosti butylhydroxytoluenu jako antioxidantu. Extrakt se po naředění roztokem tetrahydrofuran – voda (1+1) analyzuje na koloně C18 (Zorbax ODS; 4,6x250 mm) za použití mobilní fáze voda-acetonitril (525+475) pH 3,5 upravené kyselinou mravenčí a amoniakem s UV detekcí při 380 nm. Mez stanovitelnosti je 1-2 mg/kg a výtěžnost metody je vyšší než 98 %. Autoři sledovali stabilitu roztoků nifursolu a zjistili, že na stabilitu roztoků má vliv pH roztoku a citlivost na světlo. Při rozpuštění nifursolu v mobilní fázi (pH 3,5) dochází k hydrolýze nifursolu, dokonce i ve tmě a dostáváme nižší výsledky než očekáváme. K rozkladu nedochází ve směsných rozpouštědlech voda – tetrahydrofuran. K zamezení rozkladu nifursolu autoři použili butylhydroxytoluen a při koncentraci 100 µg/ml jsou roztoky nifursolu stabilní nejméně 24 hodin. Byly porovnány rovněž různé způsoby extrakce různými organickými rozpouštědly, jako zcela nevhodné se ukázalo použití způsobu extrakce acetonitrem v Soxhletově aparatuře popsané v metodě⁸, kdy dochází k rozkladu při naředění extraktu v mobilní fázi pH 3,5.

V souladu s koncepcí pro monitorování nežádoucích doplňkových látek bylo proto nutno vyvinout rychlou a spolehlivou analytickou metodu, která umožňuje stanovení nifursolu ve stopových koncentracích řádově v µg/kg a zároveň snižuje pravděpodobnost interference matrice.

Experimentální část

Princip metody

Nifursol se extrahuje ze vzorku krmné směsi směsným rozpouštědlem tetrahydrofuran + acetonitril + voda (400+200+400, V+V+V), ze vzorku premixu tetrahydrofuranem za přítomnosti butylhydroxytoluenu a po případném naředění se analyzuje metodou HPLC na reverzní fázi C18 s UV detekcí při 383 nm.

Přístroje a zařízení

Extrakce vzorků byla provedena na laboratorní třepačce LT 2 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, který se skládá z vysokotlaké pumpy W515 (Waters, Milford, USA), autosampleru W717 Plus Autosampler (Waters, Milford, USA), spektrofotometrického detektoru W486 (Waters, Milford, USA) a datastanice PC Compaq. Byla použita chromatografická kolona NovaPak C₁₈, 4 µm, 4,6 x 250 mm (Waters, Milford, USA). pH roztoku bylo měřeno na pH-metru pH 526 (WTW, SRN) a pH-metr byl kalibrován na ftalátový pufr CertiPUR pH 4,01.

Chemikálie

Acetonitril, kyselina trifluoroctová byly čistoty pro HPLC (FLUKA, Švýcarsko); tetrahydrofuran, hydroxid sodný p.a. (Lachema Neratovice, Česká republika); ostatní chemikálie čistoty pro analýzy (Merck, SRN).

Mobilní fáze byla připravena smísením 380 ml acetonitrilu a 610 ml deionizované vody (Milli-Q systém, Millipore, Bedford, MA, USA), přidá se 10,0 ml kyseliny trifluoroctové a pH tohoto roztoku se upraví vodným roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 12 mol.l^{-1} na hodnotu $\text{pH} = 4,5$.

Extrakční roztok pro krmné směsi byl připraven smísením 400 ml tetrahydrofuranu, 200 ml acetonitrilu a 400 ml vody.

Kalibrační roztoky o koncentraci 4,0; 8,0; 16,0 a 40,0 mg.l^{-1} byly připravené postupným ředěním základního roztoku nifursolu (Solvay Pharmaceuticals) v tetrahydrofuranu o koncentraci 100 mg.l^{-1} extrakčním roztokem pro krmné směsi.

Výběr vzorků

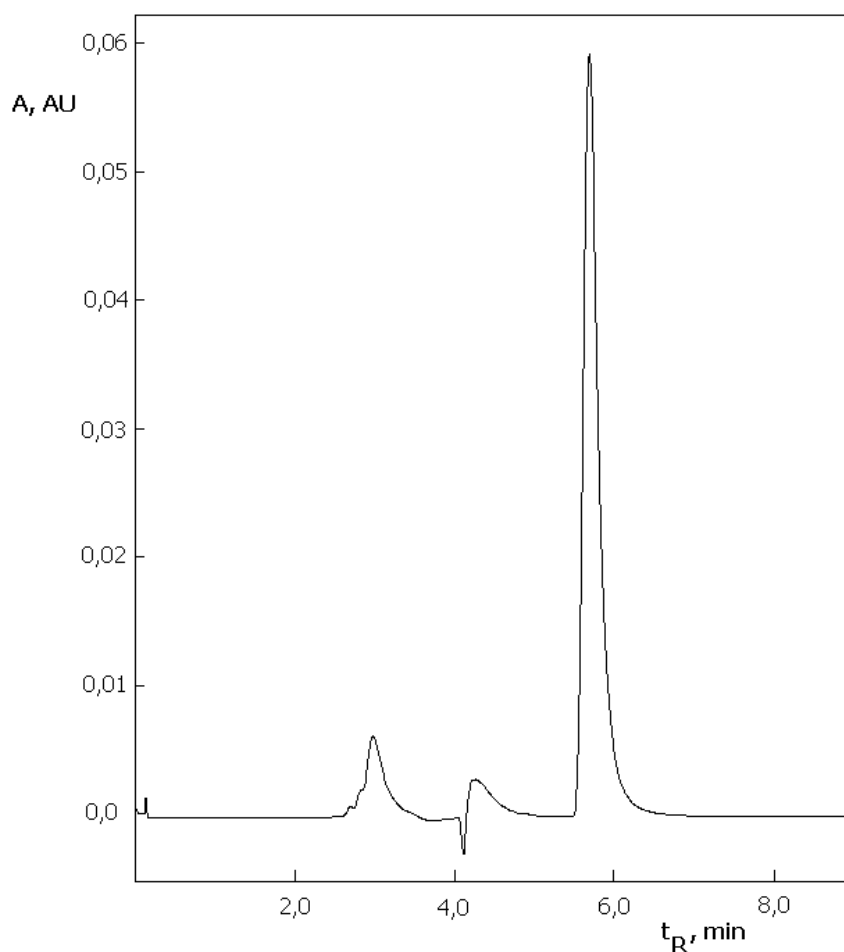
Analýzy byly prováděny na reálných vzorcích finálních krmiv odebraných v rámci státního odborného dozoru, zákon o krmivech §16 a §17(cit.¹⁰) a na modelových vzorcích krmiv o složení: 45 % pšenice, 15 % ječmen, 12 % sojový extrahovaný šrot, 8 % masokostní moučka, 5 % krevní šrot, 5 % úsušky píce, 4 % vápenec a 1 % premix minerálních látek a vitaminů s přídatkem nifursolu o koncentrační hladině 5 000, 10 000, 15 000, 20 000 a 30 000 mg.kg^{-1} . Všechny vzorky se upraví homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku.

Pracovní postup

Pro krmné směsi: 20 g zkušební vzorku se extrahuje 100 ml extrakční směsí 30 minut ve 250 ml kónické baňce na laboratorní třepačce a pak 10 minut na ultrazvukové lázni. Takto získaný extrakt se použije přímo k HPLC analýze.

Premixy doplňkových látek: 2 g vzorku se extrahuje 150 ml tetrahydrofuranu v odměrné baňce na 250 ml 30 minut a poté ještě 10 minut na ultrazvukové lázni. Přidá se 80 ml vody, vytemperuje na laboratorní teplotu a doplní vodou po značku a promíchá. Extrakt se přefiltruje, popřípadě naředí na koncentraci asi 15 mg/l extrakční směsí pro krmné směsi a použije k HPLC analýze. V případě, že je extrakt zakalený, odstředí se 5 minut při

10 000 ot.min⁻¹ a dávkuje na chromatografickou kolonu. HPLC podmínky jsou uvedeny v tabulce I. Chromatogram separace je ukázán na obr. 2.



Obr. 2: Chromatogram separace nifursolu. Vzorek premix Aminovitan KR1-AV Plus. Separační charakteristiky: $k = 1,52$, $N = 5300$, $t_a = 1,43$.

Tabulka I : HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Kolona	NovaPak C18, 4 μ m, 4,6 x 250 mm
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	10 μ l
Detektor UV	383 nm

Výsledky a diskuse

Volba kalibračního modelu

Při lineární kalibraci byla testována volba vhodného kalibračního modelu a výpočet odhadu jeho parametrů a výpočet směrodatné odchylky. Při výpočtu hodnot koeficientů a , b se vycházelo z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny hodnoty závisle proměnné - použití metody nejmenších čtverců. Byly vypočteny hodnoty koeficientů $a = 2\,103,4$ (směrodatná odchylka 5907,0) a $b = 51154,0$ (směrodatná odchylka 268,5) pro hladinu významnosti $P=0,95$. Korelační koeficient $r = 0,99997$.

Směrodatná odchylka s_{yx} , která charakterizuje rozptýlení kolem regresní přímky, byla vypočtena $s_{yx} = 7498,8$.

Porovnání odhadů koeficientů a , b se skutečnými hodnotami parametrů a , b , bylo provedeno použitím Studentova t-testu při testování pro $a = 0$ a $b = 1$. Vypočtené t-hodnoty Studentova rozdělení jsou pro $t_a = 0,356$ a $t_b = 190,5$. Protože $t_a < t(P = 0,95; f=4,303)$ je rozdíl koeficientu a od nuly statisticky nevýznamný a může se předpokládat závislost typu $y = b_0x$. Testováním regresního koeficientu b proti očekávané hodnotě $b = 1$ platí $t_b > t(P = 0,95; f=4,303)$ a $b \neq 1$.

Vypočtené hodnoty b_0 závislosti typu $y = b_0x$, směrodatná odchylka s_{yx}' , která charakterizuje rozptýlení kolem regresní přímky pro předpoklad $a = 0$ a testování rozptylů obou koeficientů b pomocí F-testu jsou následující: $b_0 = 51227,9$, $s_{yx}' = 6313,8$ a $F = 950,8$. Pro kalibrační přímku platí, že $F > F(v_1 = 1, v_2 = m-2; 18,513)$ a platí závislost typu $y = a + bx$.

Přesnost a shodnost

Vzhledem k tomu, že nejsou dostupné certifikované referenční materiály, byla přesnost metody (těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou) ověřena analýzou modelových vzorků. Pro každou koncentrační hladinu byl vzorek analyzován 5 krát. Výsledky a vypočtené statistické parametry (hladina významnosti $P=0,95$) jsou uvedeny v tabulce II. Celková výtěžnost metody pro koncentrační hladiny 5 000 až 30 000 mg.kg⁻¹ je $(104,3 \pm 3,0) \%$. Nalezené hodnoty modelového vzorku byly s očekávanými hodnotami srovnány pomocí lineární regrese. Očekávané hodnoty byly považovány za nezávisle proměnné, nalezené hodnoty za závisle proměnné. Konstanta a regresního vztahu (konstantní soustavná odchylka) má hodnotu $280,1 \pm 319,5$ a statisticky se neliší od nuly. Konstanta b regresního vztahu

(proporcionální soustavná odchylka) má hodnotu $1,0197 \pm 0,0171$ a neliší se statisticky od jedničky. Metoda poskytuje přesné výsledky.

Tabulka II: Výtěžnost metody – výsledky měření a vypočtené statistické parametry pro vzorky premixů

Statistické parametry					
Očekávaná hodnota [mg/kg]	5 128	10 256	15 384	20 515	30 768
Nalezená hodnota [mg/kg]	5 345	11 075	16 072	20 785	31 796
Výtěžek metody [%]	104,2	108,0	104,5	101,3	103,3
Interval spolehlivosti	3,4	4,0	9,0	7,5	8,6
Relativní směrodatná odchylka [%]	1,4	1,6	3,6	3,0	3,5

Shodnost metody (míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek) byla pouze omezena na výpočet opakovatelnosti, která byla vypočtena ze směrodatné odchylky rozpětí obou paralelních stanovení reálných vzorků krmiv, jejichž celkový počet byl 25. Po vyloučení odlehlých výsledků (Cochranův test) pro obsahy 33 až 74 mg/kg má opakovatelnost hodnotu 4,6 mg/kg, pro obsahy 2 000 až 30 000 mg/kg má opakovatelnost hodnotu 6,7 % relat. Reprodukovatelnost metody byla stanovena mezilaboratorní porovnávací zkouškou.

Mezilaboratorní porovnávací zkouška

Mezilaboratorní porovnávací zkoušky se zúčastnilo 7 laboratoří za podmínek normy ISO 5725-1986 (cit.¹¹) a bylo provedeno vyhodnocení ukazatele opakovatelnosti a reprodukovatelnosti dané metody. Ke statistickému testování odlehlosti hodnot byl použit Cochranův jednostranný test odlehlosti a Grubbsův test v kombinaci s tímto postupem:

- je-li $P > 5\%$, tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu menší než její pětiprocentní kritická hodnota, považuje se testovaná hodnota za správnou

- je-li $5\% \geq P > 1\%$, tj. leží-li testovaná charakteristika mezi jednoprocenní a pětiprocentní kritickou hodnotou, nazve se testovaná hodnota hodnotou vybočující a označí se jednou hvězdičkou ^{*)}

- je-li $P \leq 1\%$, tj. je-li testovaná charakteristika Grubbsova nebo Cochranova testu větší než její jednoprocenní kritická hodnota, nazve se testovaná hodnota hodnotou odlehlou a označuje se dvěma hvězdičkami ^{**)} .

Výsledky mezilaboratorního kruhového testu jsou sestaveny do tabulky III. Z výsledků mezilaboratorní porovnávací zkoušky je zřejmé, že ukazatel opakovatelnosti stanovení nifursolu metodou HPLC pro obsahy 50 až 70 mg/kg dosahuje hodnoty 2 až 16 % relativních a ukazatel reprodukovatelnosti se pohybuje v rozmezí 4 až 17 % relativních, pro obsahy 2 000 až 12 000 mg/kg dosahuje ukazatel opakovatelnosti 3,5 až 16 % relat. a ukazatel reprodukovatelnosti 13 % relat.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibračního modelu. Mez detekce odpovídá hodnotě koncentrace, pro kterou je dolní mez $(1-\alpha)\%$ ního intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna kritické úrovni a mez stanovitelnosti je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá hodnotě 0,1 (cit.¹²). Mez detekce má hodnotu $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. pro standardní operační proceduru 8 mg.kg^{-1} a mez stanovitelnosti má hodnotu $1,8 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. pro standardní operační proceduru 9 mg.kg^{-1} .

Optimalizace mobilní fáze

Mobilní fáze byly optimalizovány tak, aby retenční faktor byl $k \geq 1,5$, počet teoretických pater $N \geq 5\,000$ a asymetrický faktor $t_a \leq 1,4$ (obr.2). V mobilní fázi byl sledován vliv koncentrace organického rozpouštědla, vliv pH mobilní fáze, koncentrace pufru a teploty separace na retenční faktor.

Tabulka III: Výsledky mezilaboratorní porovnávací zkoušky.

Laboratoř č.	Vzorek				
	1	2	3	4	5
	Průměr [mg/kg]				
9	49,7*)	63,9	54,5	10 750	2035
2	52,1	70,7	60,5	11 824	1 755*)
12	52,6	67,6	56,3	11 689	1 978
3	53,0	70,3	59,5	11 206	1 945
8	53,4	70,5	58,7	12 056	1 965
16	54,0	71,5	59,9	12 002	2 021
5	57,3*)	75,7	61,5	13 181*)	1 919
Průměrná hodnota [mg/kg]	53,0	70,0	58,7	11 588	1 977
Počet neodlehých laboratoří	5	7	7	6	6
s_r [mg/kg]	0,30	3,0	10,6	21 108	12 103
s_R [mg/kg]	0,80	4,2	11,3	271 384	8 032
r [mg/kg]	0,90	8,5	9,1	407	308
R [mg/kg]	2,20	11,8	9,4	1 459	251

s_r - Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_R - směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, r - ukazatel opakovatelnosti, R - ukazatel reprodukovatelnosti. Bližší vysvětlení v textu.

V tabulce jsou uvedeny pouze průměry dvou paralelních stanovení, které jsou k nahlédnutí u autora.

Vliv koncentrace organického rozpouštědla ϕ v mobilní fázi na retenční faktory chromatografované látky k byl popsán rovnicí:¹³

$$k = k_a 10^{-mj}$$

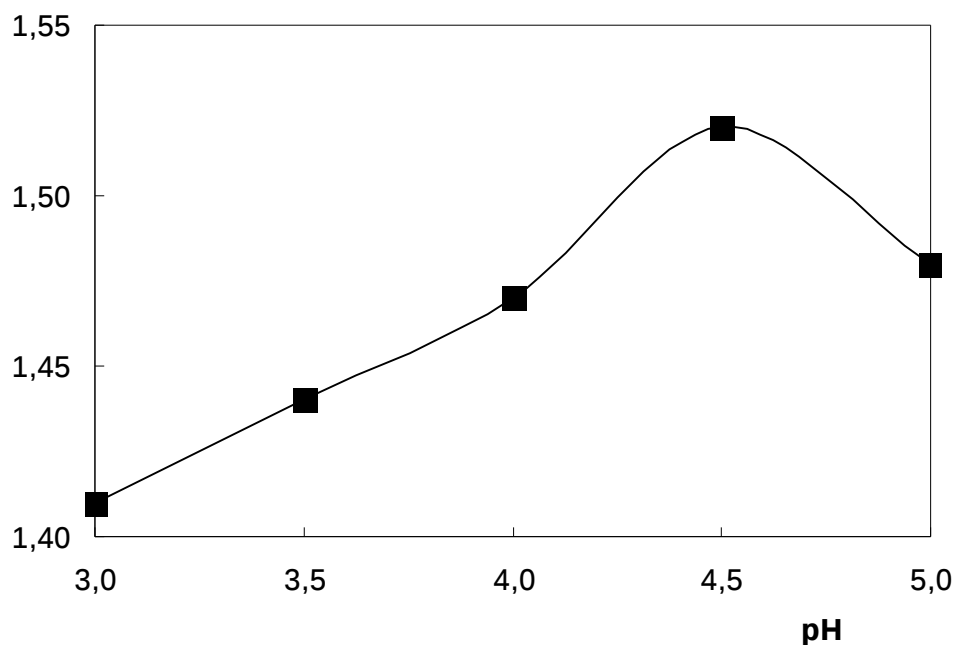
kde retenční faktor k_a je retenční faktor v čisté vodě jako eluentu, získaný extrapolací experimentálních údajů a m je parametr přímo závislý na síle organického solventu a povaze solutu. V logaritmické formě přejde rovnice na tvar

$$\log k = \log k_a - mj$$

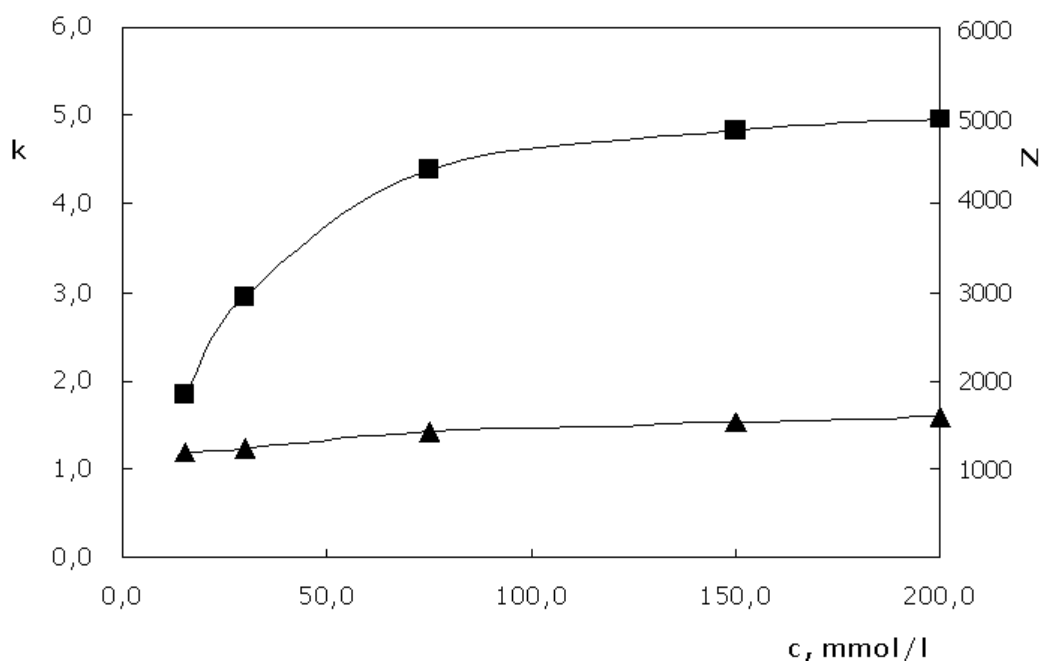
a logaritmy retenčních faktorů klesají s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi. Experimentálně byla zjištěna lineární závislost mezi koncentrací acetonitrilu (v koncentračním rozmezí $j = 0,36$ až $0,42$) a logaritmem retenčního faktoru a rovnice pro mobilní fázi má tvar: $\log k = 1,7885 - 4,0607 j$ s korelačním koeficientem $r = - 0,9867$.

Při sledování vlivu pH mobilní fáze v rozsahu pH 3,0- 5,0 na retenční faktor nifursolu bylo pH mobilní fáze upraveno vždy hydroxidem sodným na požadovanou hodnotu pH. Jako optimální pH mobilní fáze jsme zvolili pH 4,5, kdy je retenční faktor ($k = 1,52$) a účinnost kolony vyjádřená jako počet efektivních pater ($n_{ef} = 1900$) nejvyšší a (obr. 3).

Vliv koncentrace pufru na retenční faktor a účinnost kolony byl sledován pro látkové množství 15, 30, 75, 150 a 200 mmol.l⁻¹ trifluoroctové kyseliny v mobilní fázi. pH mobilní fáze bylo upraveno vždy na hodnotu pH = 4,5. Podle předpokladu retence nifursolu klesá a účinnost kolony roste s rostoucí koncentrací pufru (obr. 4). Jako optimální byla zvolena koncentrace pufru 150 mmol.l⁻¹, kdy se retence i účinnost kolony mění již minimálně a zůstává konstantní.



Obr. 3: Vliv pH mobilní fáze na retenční faktor k .

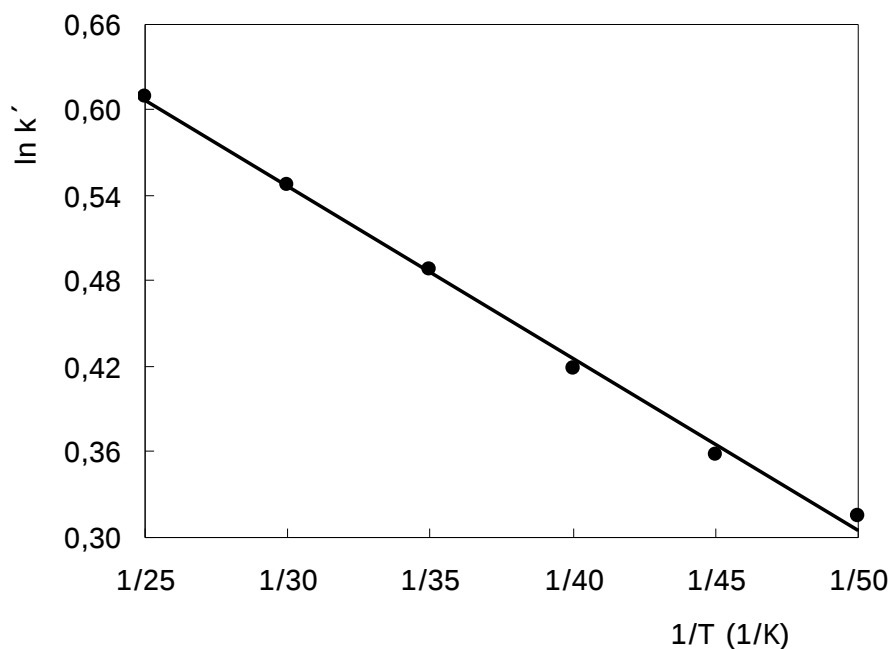


Obr. 4: Vliv koncentrace trifluoroctové kyseliny na retenční faktor k a účinnost kolony N .

Retence solutu s rostoucí teplotou klesá a $\log k$ je lineární funkcí převrácené hodnoty teploty, T . Tento závěr odpovídá obecnému tvaru van't Hoffových závislostí pro chromatografický proces^{14,15}:

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \frac{V_s}{V_M} = A + \frac{B}{T}$$

kde ΔH° , ΔS° jsou entalpie a entropie solutu v daném chromatografickém systému, R je plynová konstanta a A , B jsou konstanty závislé na chromatografickém systému. Experimentální závislosti jsou v dobré shodě s těmito závěry a na obr. 5 jsou uvedeny závislosti $\log k$ na $1/T$ pro separaci nifursolu. Ze závislosti byly vypočteny konstanty $A = -3,2972$, $B = 1164,6$ s korelačním koeficientem $r = 0,9989$. S přihlédnutím k získaným výsledkům byla zvolena mobilní fáze jako optimální z hlediska selektivity a účinnosti separace.



Obr. 5: Závislost logaritmu retenčního faktoru nifursolu na teplotě.

Kompatibilita chromatografických kolon

Porovnání chromatografických kolon a jejich chromatografických parametrů je uvedeno v tabulce tabulce IV.

Tabulka IV

Kolona	Retenční čas (min)	Retenční faktor (k')	Počet teoretických pater (N)	Asymetrický faktor (t_a)
NovaPak C18	5,70	1,48	4 496	1,75
SymmetryShield RP8	6,11	3,89	7 431	1,21
Agilent Eclipse XDB-C18	4,57	2,81	6 052	1,18
Agilent Zorbax Extend-C18	4,29	2,58	5 470	1,26
Agilent Zorbax SB-C18	4,94	3,12	6 545	1,22
BDS HYPERSIL C18	2,06	0,71	1 843	1,39
SUPELCOSIL ABZ+PLUS	4,11	2,42	3 300	1,15
PHENOMONEX Prodigy ODS3	6,32	4,27	8 665	1,25
Symmetry C18	4,17	2,34	4 088	1,30

Všechny testované kolony se ukazují jako vhodné pro separaci nifursolu, jako nejvýhodnější se ukazuje kolona SUPELCOSIL ABZ⁺Plus a Agilent Eclipse XDB-C18, jako zcela nevhodná kolona BDS HYPERSIL C18 na které má nifursol nízký retenční faktor a účinnost kolony.

Revalidace metody

Stabilita standardu

Základní roztok standardu avilamycinu je nutné připravovat vždy čerstvý.

Kriteria pro revalidaci systému – limity pro přijetí metody

- 4 výtěžnost metody pro obsah 20 mg/kg > 95 % (ověření extrakce).
- 4 účinnost kolony $N \geq 5\,000$, $k \geq 1,5$ a $t_a \leq 1,4$ (úprava mobilní fáze, změna kolony).
- 4 mez stanovitelnosti (vypočtený z kalibrační přímky) 1,8 mg/l
- 4 ukazatel opakovatelnosti > 20 % relat.

Literatura

1. Vyhláška č. 194/1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí zákon o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. Zietlow D.C., Morrison J.L.: J.Assoc. Off. Anal. Chem. 53, 1085 (1970).
3. Zietlow D.C., Morrison J.L.: J.Assoc. Off. Anal. Chem. 54, 66 (1971).
4. Analytical Methods Committee: Analyst 98, 908 (1973).
5. Wheals B.B., Weston R.E.: Analyst, 96, 78 (1971).
6. Koul G.L., Nigam S.S.: Riechstoffe Arom. Körperpflegen 17, 223 (1969).
7. George G.M., Frahm L.J., McDonnell J.P.: J.Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 1085 (1981).
8. Analytical Methods Committee: Analyst 110, 1013 (1985).
9. De Vries E.J., Bas R.C., Kuil H.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 77, 1347 (1994).
10. Zákon č. 91/1996 Sb , o krmivech ve znění pozdějších předpisů.
11. ČSN 01 0251 (eqv. ISO 5725-1986), Stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované zkušební metody pomocí mezilaboratorních zkoušek, ÚNM Praha 1988 .
12. Meloun M., Militký J.: Statistické zpracování experimentálních dat na osobním počítači, FINISH, Pardubice 1992.
13. Berendsen G. E., Galan L.: J. Chromatogr. 196, 21 (1980).
14. Colin H., Guiochon G.: J. Chromatogr. 158, 183 (1978).
15. Jinno K., Ozaki N.: J. Liquid Chromatogr. 7, 877 (1984).